

UCh-FC
Biotecnología
P 438
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Efecto de angiotensina 1-7 sobre la capacidad miogénica en células satélites adultas”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero Biotecnología Molecular.

Sebastián Gabriel Pérez González

Director del Seminario de Título: Dr. Claudio Cabello-Verrugio.

Co-Director: Dr. Hugo Olguín Marín

Patrocinante: Dr. Miguel Allende Connelly

Enero 2017
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el candidato

SEBASTIÁN GABRIEL PÉREZ GONZÁLEZ

“Efecto de angiotensina 1-7 sobre la capacidad miogénica en células satélites adultas”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Claudio Cabello Verrugio

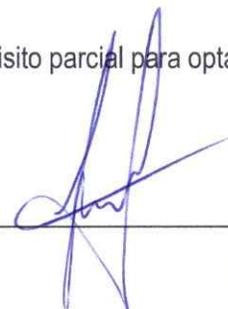
Director Seminario de Título

Dr. Hugo Olguín Marín

Co-Director Seminario de Título

Dr. Miguel Allende Connelly

Prof. Patrocinante del Seminario







Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Verónica Palma Alvarado
Presidenta y evaluadora





Dr. Juan Carlos Casar Leturia
Evaluador

Santiago de Chile, Enero de 2017

Biografía

Nacido hace muchos años, Sebastián fue un niño estudioso y ordenado. Criado por sus Padres Gabriela y Rubén y su Abuela Raquel, vivió en Ñuñoa sus primeros pasos en el aprendizaje y la curiosidad, inventando equipos de fútbol, y armando/desarmando figuras con bloques.

En su primera etapa escolar, estudió en el colegio Santa Marta a pasos de su casa, durante seis años de enseñanza básica. Pensaba que podía seguir allí más tiempo, pero fue tiempo de emigrar. En una jugada brillante, sus padres piden asesoría sobre qué colegio puede ser el siguiente destino. Dos opciones: uno muy bello y otro muy feo.

La elección fue compleja, el feo ganó, pero aprendió que lo más importante es el fondo. Fue bienvenido en el año 2000 en el Instituto Nacional, donde continuó sus siguientes seis años de formación escolar en aquel lúgubre pero especial lugar. Como no recordar esos partidos irreales entre tantos balones en el patio o esos asientos de madera tan cómodos. Luego de largos 3 años de adaptación y a través de las matemáticas, se desafió por primera vez en años y marcó un nuevo rumbo en su estadía en el colegio. Apareció por primera vez en su cabeza, la idea de que hay que trabajar.

En 2004, comienza una historia de amor y odio con las ciencias, que perdura hasta hoy. Comienza a ver y entender el mundo de forma global, por lo que toda carrera científica parece interesante. Corre el 2006, la indecisión lo lleva a entrar a Bachillerato en la Universidad de Chile. Pareció lo peor. Todo curso se volvió interesante, excepto uno, pero las ciencias pudieron más. Bioquímica o Biotecnología; las opciones se

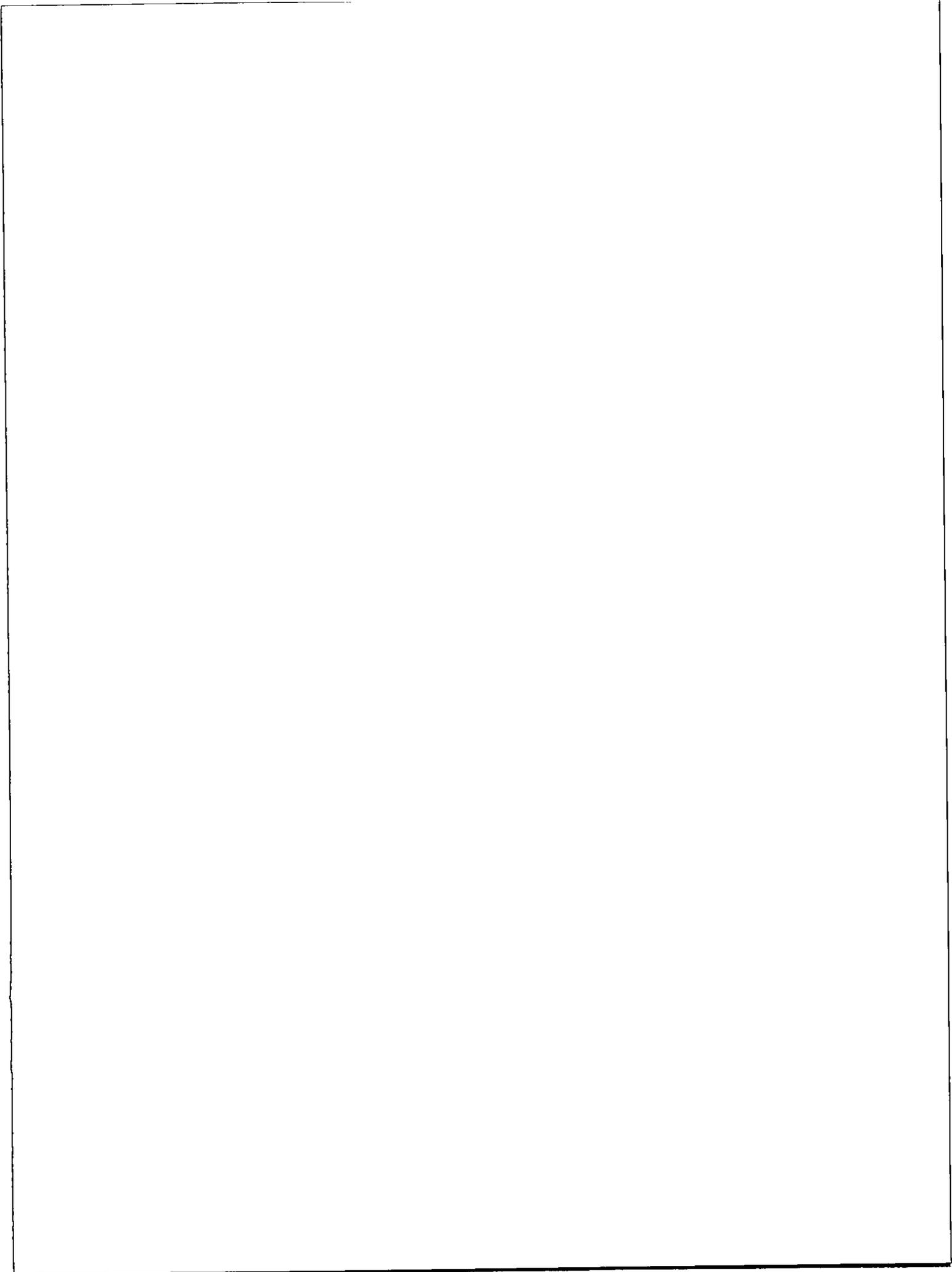
redujeron. Finalmente decidió por Ingeniería en Biotecnología Molecular. Desde el nombre algo enredado, pasando por cursos rarísimos y muy interesane; linda carrera para estudiar. Todo tomó sentido... el desafío de matemáticas, el amor y odio con las ciencias. En 2011 entró al programa de difusión de la universidad, donde se prometió a sí mismo mostrar a los pequeños seres humanos, que es posible estudiar una carrera y así ayudarlos en el difícil camino de elegir qué estudiar, pero concienzudamente. Hacia el 2013, egresa de Ingeniería en Biotecnología Molecular y una nueva decisión aparece: LA TESIS y donde hacerla.

Es así como en 2014, llega a la UC, donde trabajó con un gran equipo y logró aprender las bases de cómo hacer ciencia, un camino hermoso, pero complejo y aun así desafiante y entretenido. Sin embargo, faltaba algo más, tuvo ganas de emigrar, de un desafío mayor, quizás a destiempo, descoordinado, pero con gran decisión: Viajar solo y poder pensar en la vida y sus decisiones.

En 2016, se cumple la meta, viajar, también pudo trabajar en un nuevo rubro y aprender a tomar decisiones y seguir adelante con la vida. Termina la etapa de la Universidad; tesis entregada, aprobada, luego de muchas dudas. Pero el amor al conocer, a la ciencia pudo más... el viaje dio frutos, cumplió su propósito y hoy enfrenta el 2017 como un futuro magister. Quizás el camino ha sido largo y de muchas vueltas, no fue lo que se esperaba hace unos años, pero la transición ocurrió. Pasó de un niño tímido e indeciso a un hombre que cumple sus metas y desafíos.

“Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero los hay que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles”

Bertold Brecht



AGRADECIMIENTOS

Esta parte del seminario de título ha sido difícil de comenzar a escribir, en realidad como casi todo este escrito. En medio de complejos y cambiantes escenarios me es muy grato poder finalmente terminar esta etapa, quizás demasiado larga. Obviamente hay muchas personas a las que agradecer, partiendo por mis tutores que me dieron la oportunidad de trabajar con sus respectivos equipos de trabajo e instalaciones tanto en la Universidad Andrés Bello con el Dr. Claudio Cabello-Verrugio, como en la Pontificia Universidad Católica de Chile con el Dr. Hugo Olgún, donde pasé la mayor parte de tiempo realizando los experimentos. Agradezco sus consejos, sugerencias y tiempo. La paciencia en esperarme, en apoyarme y aguantarme cuando las cosas se me volvieron difíciles, y obviamente agradezco lo aprendido en cuanto a la ciencia y ser científico.

A mis compañeros de laboratorio, Francisco, Eduardo, Natalia, Cristina, Gloria Felipe, Susy y la vecina Daniela que compartieron tan larga historia de realización de este trabajo. Muchas horas de experimentos y reuniones con bastante constructivismo e incluso humor para discutir resultados y larguísimos y entretenidos almuerzos. Han sido el mejor equipo de trabajo con el que he compartido. Personas solidarias, alegres, grandes profesionales que me entregaron muchos consejos científicos y otros no tanto, con los cuales pude disfrutar de momentos memorables en el laboratorio y fuera de este. Ustedes han sido un gran aporte en mi formación como profesional y ser humano con cada una de sus historias y vivencias.

A mis amigos de biotecnología de la U. de Chile, Los Cazuela. Una genialidad de nombre, de casuales a amigos, siempre con una palabra de ánimo, un consejo científico o una buena talla. En especial a Mauricio, Francisco, Fernando, Susana y Gisselle, sumado a Natalia y Georthan, con quienes compartí muchas horas de estudio, varios

trabajos y grandes momentos de la vida universitaria. En muchos instantes, fueron impulsores de no decaer y seguir avanzando en la carrera y la ciencia, a pesar de todo; ustedes entienden esto. Son un ejemplo.

A mis amigos de la vida, Leonel, Roberto, Nicolás, Marcos, Francisco, Karen, y América, escuchando la queja, el mal rato, el logro y los grandes momentos, siempre disponibles para una conversa muy seria y acertada e incluso la más ridícula y loca. Son grandes en sus caminos.

A mi Familia, en especial mis primos Pablo y Cecilia, con quienes compartí mi infancia y pude conocer en su visión lo que era estar en la universidad y aprender en ella. Por supuesto que a mis padres Gabriela y Rubén que llevan muchos años aguantando a este ser humano raro en su casa, hablando de ciencias y cosas extrañas. Poniéndome el hombro cuando lo necesité, hasta el final de esta etapa, incondicionalmente. La vida ha sido difícil, me costó encontrar algunas verdades y ustedes fueron el sustento para poder terminar este ciclo y comenzar una nueva etapa de la vida. Ya era tiempo de continuar.

Gracias a esas personas que dejaron este mundo en el pasado: Raquel, Lautaro y Juan Carlos, que creyeron en mí, entregándome sus conocimientos, tiempo y cariño. Finalmente, a Paula, por el fantástico presente. Lo que viene, es parte de una nueva historia que recién comienza.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	xii-xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii-xiv
1. RESUMEN.....	xv-xvi
1. ABSTRACT.....	xvi-xvii
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Músculo esquelético y células satélite.....	1-4
2.2 Atrofia muscular y su relación con células satélite.....	4-6
2.3 Sistema renina-angiotensina y atrofia muscular.....	7-11
HIPOTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	12
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA	
3.1 Células	
3.1.1 Línea celular C2C12.....	13
3.1.2 Cultivo Primario de Mioblastos Adultos de ratón.....	13-15
3.1.3 Cultivo de Fibras.....	16
3.2 Anticuerpos.....	17
3.3 Tratamientos de CS activadas con Angiotensina 1-7 y Angiotensina II.....	18
3.4 IFI en mioblastos aislados de músculo y de fibras.....	19
3.5 Extracción y cuantificación de proteínas totales y WB.....	19-20
3.6 Softwares.....	20

4. RESULTADOS.....	21-48
4.1 Efectos de Ang-(1-7) sobre CS asociadas a miofibras de EDL en cultivo.	21-25
4.2 Ang-(1-7) estimula la proliferación y diferenciación de CS aisladas de músculo de ratón adulto.....	26-27
4.3 Incremento de dosis y tiempo de incubación con Ang-(1-7) estimula la proliferación y en mayor medida la diferenciación.....	28-48
4.3.1 Ang-(1-7) estimula la proliferación de CS aisladas de músculo de ratón adulto y de la línea celular de mioblastos C2C12 de manera diferencial.....	28-31
4.3.2 Incremento del tiempo de incubación de Ang-(1-7) mantiene el efecto sobre la proliferación de células satélite aisladas de músculo de ratón adulto hasta las 24 horas.....	32-36
4.3.3 Ang-(1-7) potencia la diferenciación de CS aisladas de músculo de ratón adulto.....	37-41
4.3.4 Incremento en tiempo de incubación de Ang-(1-7) potencia la fusión de células satélite aisladas de músculo de ratón adulto.....	42-48
5. DISCUSIÓN.....	49-55
5.1 Exposición de Ang-(1-7) activa a células satélite asociadas a fibras musculares de EDL.....	49-50

5.2 Fibras musculares de EDL, responden diferencialmente a Ang-(1-7) en cuanto a su diámetro	50-51
5.3 Ang-(1-7) potencia a la capacidad miogénica de CD activada aisladas de ratón adulto	51-54
5.4 Diferencias en rango dosis-activo de Ang-(1-7) en mioblastos primarios respecto de la línea celular de mioblastos C2C12.....	54
5.5 Perspectivas futuras de Ang-(1-7).....	54-55
6. CONCLUSIONES.....	56
7. BIBLIOGRAFÍA.....	57-68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de auto-renovación de Células Satélite y progresión de niveles proteicos en el tiempo.....	3
Figura 2: Sistema Renina Angiotensina.....	8
Figura 3: Esquema cultivo primario mioblastos aislados y asociados a miofibras.....	15
Figura 4: Ang-(1-7) incrementa la población de CS Pax7+/MyoD+ en miofibras de EDL	22-23
Figura 5: Ang-(1-7) establece dos poblaciones de miofibras de EDL en cuanto a su diámetro y evita el decrecimiento natural de este	25
Figura 6: Ang-(1-7) incrementa el número de células totales y la fusión de mioblastos primarios.....	27
Figura 7: Ang-(1-7) incrementa la proliferación de CS.....	30

Figura 8: Línea celular C2C12, responde diferencialmente a tratamiento con Ang-(1-7) con respecto a mioblastos primarios.....	31
Figura 9: Ang-(1-7) incrementa la proliferación de mioblastos primarios.....	33-34
Figura 10: Tratamiento largo con Ang-(1-7) incrementa el número de mioblastos primarios.....	36
Figura 11: Ang-(1-7) retiene marca BrdU asociado a mitotubos	38
Figura 12: Exposición a Ang-(1-7) estimula la fusión de mioblastos primarios	40-41
Figura 13: Ang-(1-7) estimula tempranamente la fusión de mioblastos primarios...	44-45
Figura 14: Ang-(1-7) estimula la capacidad miogénica de mioblastos primario.....	47-48

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang-I	Angiotensina I
Ang-II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
AraC	Arabinofuranosil citidina
BCA	Ácido bicinconínico
BrdU	Bromo-dioxi-uridina
BSA	<i>Bovine serum Albumin</i> (suero de albumina bovina)
CS	Células satélite
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>

ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECR	Enfermedad crónica del riñón
EPOC	Enfermedad obstructiva crónica del pulmón
EDL	Músculo extensor de los dedos
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
e-MHC	Embryonic myosine heavy chain (cadena pesada de la miosina embrional)
FGF	Factor de crecimiento de Fibroblastos
FNT	Factor de necrosis tumoral
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
FCI	Factor crecimiento insulínico
IL	Interleucina
mRNA	messenger of ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensajero)
MHC	<i>Myosine heavy chain</i> (cadena pesada de la miosina)
NO	Óxido Nítrico
Nox	NADPH oxidasa
PBS	Tampón Fosfato Salino
PFA	Paraformaldehído
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
SC	Suero de Caballo
SFB	Suero Fetal Bovino

SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TA	Músculo Tibial Anterior
WB	<i>Western Blot</i>

1. RESUMEN

Las células satélites del músculo esquelético son células caracterizadas por auto-renovarse y diferenciarse en precursores musculares; regulan la homeostasis y participan activamente en el proceso de regeneración del músculo en respuesta a distintos tipos de daño. Estas células tienen marcadores moleculares distintivos como Pax-7 y MyoD cuya expresión relativa permite establecer el estado de avance en la progresión miogénica. Por ello, cuando su función se ve afectada negativamente, se desarrolla atrofia muscular, fibrosis y disminución de la capacidad contráctil.

La atrofia muscular es la pérdida de masa y fuerza muscular producto de varios mecanismos donde destaca el desbalance en el metabolismo proteico. El sistema renina angiotensina (RAS) es un importante regulador de la masa y función muscular. Angiotensina II (Ang-II) es el principal péptido de la vía clásica de RAS y uno de los más importantes agentes que induce y mantiene la atrofia muscular. Además, Ang-II inhibe la proliferación de células satélite y la regeneración muscular. En contraparte, angiotensina 1-7 (Ang-(1-7)), péptido de la vía alternativa de RAS, tiene efectos opuestos a Ang-II y pudiendo prevenir la atrofia muscular dependiente o independiente de Ang-II, recuperando el tamaño de fibras musculares, mejorando la fuerza y disminuyendo la degradación de proteínas musculares. Dichos efectos estarían mediados por la activación del receptor de Ang-(1-7), Mas; sin embargo, los mecanismos involucrados permanecen poco claros. Respecto a lo anterior, no se han descrito efectos de Ang-(1-7) sobre células satélites, por lo que, en este seminario de título, se evaluó el efecto de

Ang-(1-7) directamente sobre células satélite aisladas de ratón adulto (mioblastos), analizando cambios en su activación, proliferación y diferenciación.

Los resultados de este trabajo sugieren que células satélites asociadas a miofibras tratadas con Ang-(1-7), aumentó la población de células satélites activadas, determinado por el incremento de las poblaciones celulares Pax7+/MyoD+ y Pax7-/MyoD+. Además, se encontró que la población de células marcadas solo con MyoD aumenta cerca del doble en respuesta a Ang-(1-7), lo que implica un mayor compromiso hacia la diferenciación miogénica, correlacionando con el aumento de la fusión celular.

Por otra parte, Ang-(1-7) incrementó el número de mioblastos en cultivos primarios en proliferación, así como también estimuló su diferenciación determinado por un incremento en la fusión de mioblastos.

En su conjunto, los resultados obtenidos indican que Ang-(1-7) puede regular directamente las CS en distintos aspectos de su función, favoreciendo un aumento de su activación, proliferación y diferenciación.

1. ABSTRACT

Skeletal muscle satellite cells (SC) are auto-renewal that repair the partially or completely damaged fiber and are differentiated from muscular precursor cells. SCs are vital to homeostasis and they contribute to muscular regeneration after several types of injuries have incurred. These cells possess molecular markers such as Pax-7 and MyoD which enable to identify their myogenic progression. When the function is disrupted, muscular atrophy, fibrosis and diminishment of contractile capacity of the muscle can be observed.

Muscular atrophy refers to the loss of muscular force and mass under multiple mechanisms where the deregulation of proteins metabolism forms the principal part of it. Angiotensin II (Ang-II) is the principal agent from Renin-Angiotensin System (RAS) that is an important regulator of mass and muscular function. It has been described as one of the principal agents that induces and maintains muscular atrophy. In addition, Ang-II inhibits proliferation of SC and muscular regeneration.

On the other hand, angiotensin 1-7 (Ang-(1-7)), a peptide from alternative RAS, prevents muscular atrophy with or without being dependent on Ang-II by recovering the size of myofibers, improving the muscular force and diminishing the muscular proteins degradation. These effects could be mediated by activation of Ang-(1-7) receptor (MasR). However, the mechanisms involved still remain unclear since it has no direct relationship with SC. Therefore, this paper aims to prove the direct effect of Ang-(1-7) on satellite cells

which are isolated from adult mouse (myoblast) and evaluates different cellular parameters such as activation, proliferation and differentiation.

The results in this work show that the incubated Ang-(1-7) with SC attached to myofibers increments the cell population of Pax7+/MyoD+ and Pax7-/MyoD+. It is also found that the cell population of Pax7-/MyoD+ almost doubled, thereby having myoblast committed to the myogenic differentiation, which, in turn, correlates to increase of cell fusion.

Moreover, Ang-(1-7) increased the number of myoblast through primary culture under proliferation condition and differentiation condition, thus promoting their differentiation by fusion increment of myoblast culture.

The conclusion in this work suggest that Ang-(1-7) can directly regulate the function of satellite cells on different levels of their function, stimulating an increase of their activation, proliferation and differentiation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Músculo esquelético y Células Satélite

El músculo esquelético constituye cerca de un 50% de la masa del cuerpo humano adulto, posee capacidad contráctil y mantiene la unión articulación-hueso a través de tendones, teniendo como principales funciones fisiológicas el movimiento y soporte del cuerpo, mantención de la temperatura corporal, además de albergar una porción significativa de la actividad metabólica (Biressi and Asakura, 2012). Es un tejido formado por células multinucleadas alargadas, denominadas miofibras, estructuradas desde el desarrollo embrionario como consecuencia de la proliferación, crecimiento y fusión de precursores miogénicos (Biressi and Asakura, 2012; Bonaldo and Sandri, 2013; Yin et al., 2013).

Una población de los precursores miogénicos se mantiene indiferenciado durante la etapa adulta, siendo denominadas células satélites (CS) debido a su ubicación íntimamente asociadas entre el sarcolema y la lámina basal de la miofibra. En términos morfológicos, se ha descrito que poseen un núcleo con abundante heterocromatina, rodeado de una delgada porción de citoplasma con pocas mitocondrias, pequeño retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi no desarrollado lo cual correlaciona con una baja actividad celular general (Scharner and Zammit, 2011).

En cuanto a su función, las CS han sido caracterizadas como progenitores musculares quiescentes, es decir en reposo proliferativo o G_0 (Schultz et al., 1978), con rasgos de células madres adultas (Sacco et al., 2008); además participan en la mantención del músculo adulto (Keefe et al., 2015) y son el motor de la capacidad regenerativa de este, puesto que pueden formar nuevas miofibras luego de una lesión (Kang Jong-Sun, 2011; Kuang et al., 2008; Scharner and Zammit, 2011).

Diversos estudios, han permitido conocer cómo se regula la especificación de las CS desde etapas embrionarias hasta la adultez (Rudnicki and Jaenisch, 1995; Olguin and Olwin, 2004; Zammit et al., 2004; Olguin and Olwin, 2012). Se ha demostrado que la población de CS va disminuyendo, pasando desde un 30 a 25 % de los núcleos totales del músculo en ratas perinatales, hasta un 10 % de éstos luego de 28 días del nacimiento y finalmente terminando en un 5% en la rata y ratón adulto de unos 4 meses (Allbrook et al., 1971; Venable, 1966).

Cuando las CS han sido cultivadas *in vitro* o se evalúa su progresión en la regeneración muscular *in vivo*, estas adoptan diversos destinos, indicando una alta heterogeneidad dentro de ésta población celular. Las CS que permanecen quiescentes, se caracterizan por presentar altos niveles del factor de transcripción Pax7, que impide su diferenciación. Este factor de transcripción es usado como marcador canónico de éstas células (Seale, 2000) y se conoce que inhibe la expresión/función de FRM (Factores Reguladores Miogénicos) (Zammit et al., 2004), como MyoD, Myf5, FRM4, que son factores de transcripción que inducen la adquisición del compromiso con el linaje miogénico y posterior diferenciación.

Se ha descrito que un estímulo externo del microambiente disminuye los niveles proteicos de Pax7, permitiendo la activación de las CS (Olguin et al., 2007). En esta etapa, las CS activadas co-expresan Pax7 y MyoD por lo que las células están proliferativamente activas (Zhang et al., 2010) (figura 1A). En este punto, la población de CS en proliferación se denominan mioblastos adultos y están en una fase de amplificación transitoria necesaria para la formación de nuevas miofibras (Zhang et al., 2010).

Los mioblastos que están proliferando, comienzan el proceso de diferenciación al expresar el factor de transcripción miogenina que además es necesario para la fusión de los precursores musculares entre ellos y con las fibras pre-existentes (Wang and Rudnicki, 2012) (figura 1B).

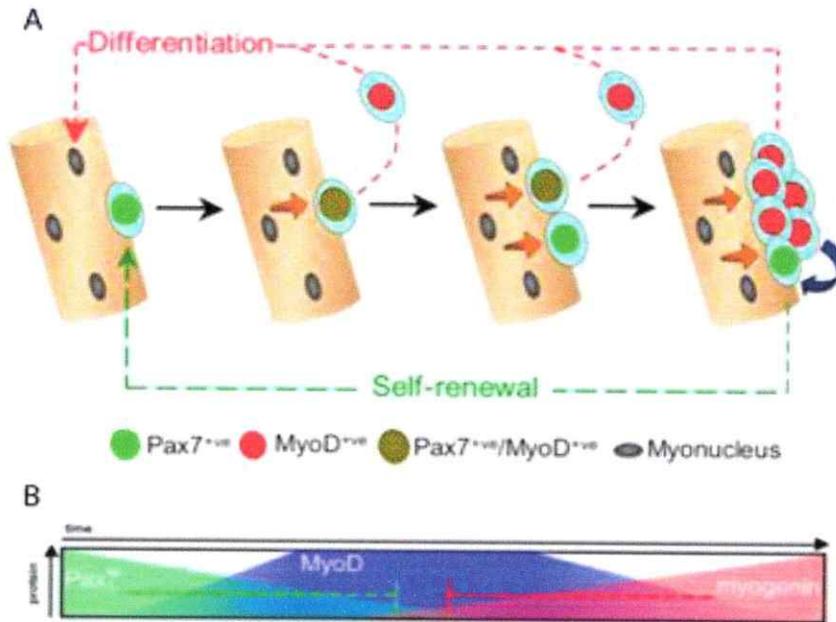


Figura 1. Modelo de auto-renovación de Células Satélite y progresión de niveles proteicos de los factores reguladores miogénicos en el tiempo. En A se muestra como una CS se activa (células mosaico verde/rojo) y da origen a mionúcleos diferenciados que forman una miofibrila muscular cuando mantienen altos niveles de MyoD y pierden expresión de Pax7 (células verdes). Por otra parte, dentro de éste grupo de células, también hay unas que pierden la expresión de MyoD (células rojas), manteniendo altos niveles de Pax7 en lo que se denomina auto-renovación. En B, se describe como varían los niveles proteicos (eje y) de Pax7, MyoD y Miogenina en el tiempo (eje x). Figura 1A modificada desde Zammit et al., 2004 y Figura 1B, modificada desde Olguin et al., 2007.

Las CS o células madre del músculo esquelético, tienen el potencial de reparar el músculo dañado (potencial miogénico), tanto por daño agudo como por enfermedades crónicas (Mourikis and Relaix, 2016). En respuesta al daño, las CS se activan, proliferan y auto-renuevan para reparar el tejido muscular y mantener una población de CS basales (Yin et al., 2013).

Cuando ha ocurrido un daño en el músculo, como por ejemplo un desgarro (Wernig et al., 1990), las CS son activadas producto de señales microambientales provenientes de la zona dañada. Estas señales incluyen quimioquinas, citoquinas y factores tróficos provenientes de células del sistema inmune (Paulsen et al., 2010) tales como TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IGF-1 (factor de crecimiento insulínico 1), IL-6, IL-10 (interleucina 6 y 10) y NO (óxido nítrico) que participan durante el proceso regenerativo. Por lo tanto, las células del sistema inmune dan lugar a funciones que van desde la remoción de restos celulares, remodelación de la matriz extracelular, hasta la estimulación de la activación y fusión de las CS (Lee et al., 1994) por lo que son fundamentales para alcanzar una respuesta regenerativa eficiente (Rigamonti et al., 2013).

Sin embargo, esta capacidad de reparar el tejido luego de un daño, puede verse afectada por ejemplo durante el envejecimiento, puesto que las CS pierden su potencial miogénico, lo que redundaría en que se ve afectada su función (Brack et al., 2007) y además se pierde masa muscular, es decir, ocurre atrofia muscular. (He et al., 2013).

2.2 Atrofia Muscular y su relación con células satélite

La atrofia muscular esquelética es caracterizada clínicamente por debilidad generalizada y disminución en la capacidad de producir fuerza debido al decrecimiento de la masa muscular, como consecuencia de la activación de los sistemas catabólicos que desencadenan la degradación de proteínas contráctiles, organelos y citoplasma de las células musculares (Allen et al., 1997; Bonaldo and Sandri, 2013).

Uno de los principales mecanismos catabólicos involucrados es el ubiquitina-proteasoma, (Morales et al., 2015) en que los genes atrogina1/MAFbx y MuRF1, aumentan su expresión. Ambos genes codifican para ubiquitina-ligasas (E3 ligasas), que son enzimas responsables de otorgar la especificidad de sustrato para la ubiquitinación y posterior degradación de la proteína blanco (Bodine et al., 2001).

La atrofia muscular aparece manifestada en condiciones como el desuso de un grupo muscular, denervación del músculo, quemaduras, fallo cardiaco, SIDA, sepsis, caquexia asociado a cáncer, entre otras y genera grave perjuicio para el organismo, pudiendo llegar a favorecer la muerte del paciente (Bonaldo and Sandri, 2013). Las CS parecen tener un rol muy importante en atrofia muscular puesto que en ratones adultos con mutación nula para *pax7* se observó una notable disminución de la proliferación e incremento de apoptosis, reducción de los niveles de expresión de MyoD y una pérdida en la capacidad normal de diferenciación, que se evidenció en disminución del diámetro e índice de fusión de miotubos, lo que resultó en una severa atrofia muscular (von Maltzahn et al., 2013)

Existen variados modelos de estudio de la atrofia muscular, entre ellos el modelo de atrofia por desuso. En ratones envejecidos (25 meses de edad) los cuales pierden movilidad, se demostró que las CS pierden su potencial proliferativo incluso después de que los ratones recuperasen su movilidad durante nueve semanas (Chakravarthy et al., 2000). En el mismo modelo, se mostró una disminución de la población de CS y también decreció la activación y diferenciación, caracterizada por la disminución en la expresión de MyoD y miogenina/desmina respectivamente (Mitchell et al., 2004). Además, las CS remanentes post estímulo atrofico, al ser aisladas y cultivadas *in vitro*, disminuyeron su proliferación y diferenciación a miotubos, lo que implica una disminución en su capacidad o potencial miogénico. (Mitchell et al., 2004; von Maltzahn et al., 2013).

En un modelo de atrofia muscular por denervación, el número de CS quiescentes disminuye significativamente (Viguie et al., 1997), por lo que las nuevas fibras musculares que se forman en el espacio intersticial de las fibras existentes, son más pequeñas lo que implica una deficiencia en la capacidad regenerativa del músculo afectado (Viguie et al., 1997; He et al., 2013).

En cuanto a la inducción de atrofia por medio de sepsis, se demostró que LPS (Lipopolisacárido, polímero formado de ácidos grasos y sacáridos de bacterias gram negativas, que induce respuesta inmune en un huésped), no solo aumentó la expresión de dos marcadores típicos de atrofia como atrogina-1 y MuRF-1, (Dehoux et al., 2003), sino que además afectó la expresión de pax7 y myoD en las CS *in vitro*, lo cual sugiere que puede contribuir a la progresión de la atrofia muscular debido a que afecta negativamente la activación y/o diferenciación de las CS (Sidique, 2013).

En otros casos de atrofia muscular generada en respuesta a enfermedades crónicas (caquexia) como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se han cultivado CS provenientes de tejidos de pacientes con esta enfermedad y se demostró un incremento del estrés oxidativo y una disminución del diámetro de miotubos cultivados, por lo que se ha considerado que esas CS tienen un potencial miogénico disminuido (Pomiès et al., 2015).

En caquexia asociada a cáncer, se ha descrito que factores del suero de pacientes caquéticos provoca una desregulación en los niveles de Pax7 en las CS, lo que finalmente desencadena una deficiencia en el potencial miogénico, afectando en particular el proceso de diferenciación y fusión miogénica (Tuca Rodríguez et al., 2010). Es más, con solo desregular la función de las CS, sobre-expresando los niveles de Pax7, es suficiente para generar atrofia (He et al., 2014).

2.3 Sistema renina-angiotensina y atrofia muscular

Existen varios factores difusibles que gatillan y/o estimulan la pérdida de proteínas musculares. Uno de ellos es Ang-II que forma parte del sistema renina-angiotensina, caracterizada por dos ejes que generan péptidos con diferentes actividades biológicas (figura 2). La activación del eje clásico a través del receptor AT1R, promueve vasoconstricción mediante la secreción de la hormona aldosterona induciendo la contracción de la musculatura lisa asociada a vasos sanguíneos (Kalupahana and Moustaid-Moussa, 2012). En este eje, la enzima proteolítica renina es sintetizada en células de riñón y liberada en respuesta a cambios en el nivel de la presión arterial sistémica. Renina actúa sobre el angiotensinógeno proveniente del hígado, escindiéndolo y produciendo Ang-I (Du et al., 2004; Chappell et al., 2014).

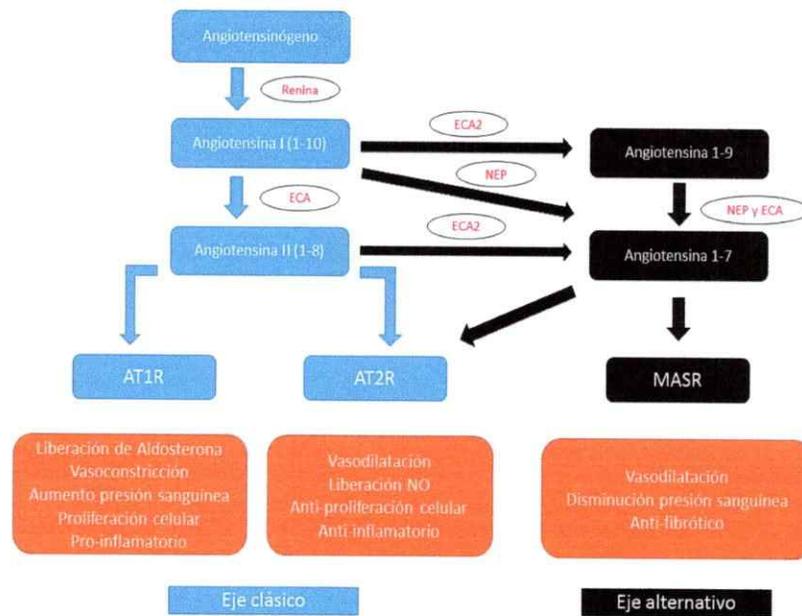


Figura 2. Sistema Renina-Angiotensina. Esquema que muestra como son formados los péptidos ANG-II y Ang-(1-7). ECA/ECA2: enzima convertidora de angiotensina. NEP: Endopeptidasa neutra. Modificado de (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008; Corrêa et al., 2015).

Ang-I, es convertida en Ang-II por la enzima convertidora de angiotensina. Ang-II actúa como ligando de los receptores AT1R y AT2R, ambas glicoproteínas con siete segmentos transmembrana altamente expresados en CS (Yoshida et al., 2013, 2014).

Ang-II es el mayor regulador del balance de sodio y fluidos, mediante su receptor AT1R, controlando la sed, liberación de vasopresina y aldosterona. Por otra parte, se ha descrito que puede causar liberación de radicales libres y estar involucrado en una respuesta inflamatoria en el envejecimiento. Además, mediante un segundo receptor, AT2R, se ha mostrado que estimula vasodilatación, liberación de NO e inhibición del crecimiento celular (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008).

Existe evidencia de que Ang-II gatilla atrofia muscular en distintas condiciones, como por ejemplo en el desarrollo de cáncer-caquexia (Sanders et al., 2005) y

presumiblemente también en sepsis (Doerschug et al., 2010), dado un aumento de la actividad de renina y por ende en los niveles de Ang-II, lo que contribuye a un incremento del estrés oxidativo (Doerschug et al., 2010) y de la disfunción endotelial (Lund et al., 2007). En músculo, el incremento de Ang-II induce la expresión de marcadores atroficos atrogina-1 y MuRF1 (Wray et al., 2003) y una reducción de la señalización IGF-1, lo que lleva a una degradación excesiva de proteínas (Brink et al., 1996). Adicionalmente, Ang-II estaría involucrada directamente en la inhibición de la síntesis de proteínas en miotubos (Russell et al., 2006).

Infusiones de Ang-II en ratones, a través de mini bombas osmóticas, indujeron pérdida del apetito, disminución de masa muscular y peso; lo cual se correlaciona con la disrupción de la señalización de IGF-1 (Factor de crecimiento tipo insulínico-1), aumento de la degradación de proteínas y apoptosis mionuclear (Brink et al., 2001; Guo et al., 2012; Meneses et al., 2014). Además, se ha mostrado que se incrementa la expresión de los marcadores genéticos atroficos, sumado a una baja del diámetro de fibras musculares, pérdida de la fuerza muscular y disminución de la proteína e-MHC en músculo gastrocnemio (Cisternas et al., 2015).

Por otra parte, se conoce que los efectos atroficos de Ang-II en el músculo esquelético son indirectos, mediados por moléculas como citoquinas y glucocorticoides (Zhang et al., 2009), lo cual es consistente ya que las fibras musculares adultas expresan poco o nada receptores para Ang-II (Zhang et al., 2009; Yoshida et al., 2013). Sin embargo, recientemente se ha mostrado que Ang-II actúa directamente en el músculo esquelético vía las CS, las cuales expresan altos niveles de AT1R y además, puede inhibir su proliferación (Yoshida et al., 2013). Conjuntamente, ratones a los que se les suministró una infusión de Ang-II, que desencadena atrofia muscular (Rezk et al., 2012), al inyectarlos intramuscular con cardiotoxina, presentaron una disminución en la

regeneración muscular, apreciándose una menor cantidad de mionúcleos centrales (marcador histológico de regeneración muscular) y un menor diámetro de las fibras regenerantes (Yoshida et al., 2013). Esto tendría dos posibles explicaciones:

a) El efecto de Ang-II a nivel muscular aumenta los niveles de Nox que producen especies reactivas de oxígeno (Pendergrass et al., 2009; Cabello-Verrugio et al., 2011; Morales et al., 2012, 2014) y activan la producción de TGF- β (Factor de crecimiento transformante beta, que regula distintas funciones celulares), el cual posee un efecto pro-fibrótico y aumenta el contenido de proteínas extracelulares inhibiendo la diferenciación de mioblastos (Mendias et al., 2012; Droguett et al., 2010).

b) El rol de CS directamente en atrofia muscular ha sido poco caracterizado, sin embargo, se conoce que disminuye el número de CS post-estímulo atrofico (Brack et al., 2005) y que una atrofia prolongada y/o más severa acentúa la reducción de estas células (Verdijk et al., 2012). Además, en un modelo de enfermedad crónica de riñón, que produce atrofia muscular, la función de las CS se ve alterada (Zhang et al., 2010b). Por otra parte, como ya se indicó, cuando se induce atrofia con Ang-II mediante AT1R, ocurre una depleción del reservorio de CS y posterior inhibición de la proliferación de la población remanente de éstas. (Yoshida et al., 2013). Finalmente, condiciéndose con lo anterior, cabe mencionar que bajo condiciones de atrofia, estimular la activación y proliferación de CS puede revertir la atrofia muscular (Hauerslev et al., 2014).

De forma paralela a la producción de Ang-II, se encuentra el eje alternativo en que se produce Ang-(1-7) mediada por la actividad ACE-2 (*angiotensin converter enzyme 2*) que escinde a la Ang-II, formando Ang-(1-7).

Ang-(1-7) -de menor vida media que Ang-II y sin efectos tóxicos en humanos- (Yamada et al., 1998; Rodgers et al., 2006) sirve como ligando del receptor de transmembrana Mas, gatillando respuestas opuestas a Ang II como vasodilatación, efectos anti-fibróticos y anti-apoptóticos (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008; Muñoz et al., 2010; Passos-Silva et al., 2013; Meneses et al., 2014).

Respecto a sus acciones en músculo esquelético, se ha descrito que atenúa la formación de especies reactivas de oxígeno (Gwathmey et al., 2010), lo cual es consistente con trabajos que han demostrado que Ang-(1-7) baja la expresión de TGF- β inducida por Ang-II en músculo esquelético (Morales et al., 2014). Sumado a esto, Ang-(1-7) se ha postulado como protector crónico de daños tisulares en músculo esquelético, restaurando tanto la arquitectura tisular como la fuerza muscular en ratones *mdx* (modelo murino de distrofia de Duchenne) (Acuña et al., 2014). En este modelo, la carencia de distrofina -proteína que conecta el citoesqueleto de las fibras musculares y que las protege contra daños mecánicos- se correlaciona con la degeneración progresiva de los músculos y la formación de tejido conectivo fibrótico (Klingler et al., 2012).

Adicionalmente, se ha descrito que el receptor Mas se expresa en músculos gastrocnemio y tibialis anterior (Morales et al., 2015) y que el aumento de su expresión previene el incremento de parámetros atróficos como la activación del sistema proteasómico, la disminución del diámetro de fibras y la cantidad de proteína MHC (Cisternas et al., 2015).

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores, es posible plantear que Ang-(1-7) puede influenciar directamente la función de las CS, favoreciendo su capacidad proliferativa y/o de diferenciación (Cisternas et al., 2015).

Hipótesis

Angiotensina 1-7 potencia la capacidad miogénica (activación, proliferación y diferenciación) de células satélites activadas.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar el efecto de Angiotensina 1-7 sobre la activación, proliferación y diferenciación de células satélites.

Objetivos Específicos

- a) Evaluar el efecto de angiotensina (1-7) sobre la activación cultivos de células satélites asociadas a miofibras de músculo de ratón adulto.
- b) Evaluar el efecto de angiotensina 1-7 sobre la proliferación y diferenciación de células satélites aisladas.
- c) Evaluación de curvas de dosis y tiempo de incubación en proliferación y diferenciación respectivamente.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA



3.1 Células

3.1.1 Línea celular C2C12

Células obtenidas desde mioblastos de ratón adulto (ATCC CRL-1772) (Yaffe and Saxel, 1977) fueron cultivadas en condiciones de crecimiento, DMEM (GIBCO®), penicilina/estreptomicina 1% v/v, suero fetal bovino (SFB) al 10% y mantenidas en atmósfera controlada a 37°C y 5% CO₂. Una vez las células alcanzaron el 70% de confluencia, se usó Tripsina-EDTA 0,05% para despegarlas de la placa y realizar un pasaje. Para diferenciar las células, éstas primero debieron alcanzar un 70-80% de confluencia en la placa de cultivo y fueron lavadas con medio salino PBS (pH 7,4) y luego cultivadas en condición de diferenciación, DMEM (GIBCO®) penicilina/estreptomicina 1% v/v y suero de caballo (SC) al 5% (Olguín and Olwin, 2004).

3.1.2 Cultivo Primario de Mioblastos Adultos de ratón

La obtención de mioblastos primarios se realizó por medio del sacrificio de ratones C57BL/6 (2-6 meses de edad). Primero, se anestesiaron con isoflurano al 3% en una cámara especialmente diseñada y posteriormente se sacrificaron con el método de dislocación cervical. Alternativamente, los ratones pudieron ser sacrificados directamente sometiéndolos a un 5% de isoflurano. Este procedimiento cuenta con el permiso del comité bioético de la Pontificia Universidad Católica de Chile y se encuentra enmarcado en los proyectos Fondecyt 1130631, Fondecyt 1120380 y AFM 16670. Una vez el animal fue sacrificado, se disectaron sus dos patas traseras y se obtuvieron

variados músculos como cuádriceps, extensor digital largo (EDL), tibialis anterior (TA), Gastrocnemio (GN), cuidando de remover la mayor parte del tejido adiposo y la fascia que recubre los músculos (figura 3).

Una vez removidos los músculos, se dejaron en medio F12C (F12, 0,2M CaCl₂) para su mantención y lavado. Luego, los músculos fueron cortados, triturados y homogenizados para posteriormente ser incubados en colagenasa tipo II (Worthington 265 U/mg) por al menos 45 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, el homogenizado se filtró y luego sembró durante 2 a 3 horas en placas plásticas con medio F12-C suplementado con SC al 15% para descartar otros tipos celulares como fibroblastos, debido a la adherencia diferencial entre éstos y los mioblastos. Finalmente, el sobrenadante de la placa fue traspasado a una placa con gelatina al 0,66% preparada previamente en la cual los mioblastos si se adhieren. Al día siguiente el sobrenadante se traspasó a una nueva placa para expandir el cultivo. Pasados 2 días de proliferación, se sembraron todas las células obtenidas o una fracción de acuerdo a la confluencia que se desee obtener.

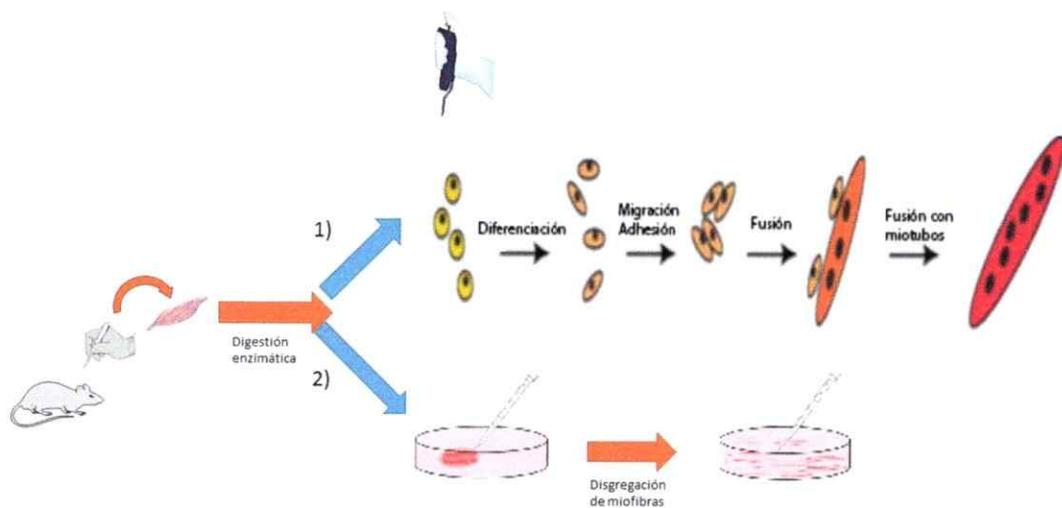


Figura 3. Esquema cultivo primario mioblastos aislados y asociados a miofibras.

Primero se disectan los músculos, luego se tritura y digiere enzimática para finalmente sembrar las células satélites aisladas (1). En el caso de las miofibras, se digiere directamente (sin triturar) y luego se separan mecánicamente las miofibras para obtener células satélites asociadas a estas (2) En el caso de las células aisladas, al disectar el músculo se produce una señal de daño que activa las células satélites, por lo que se hablará en general de cultivo de mioblastos. Estos mioblastos, posteriormente se diferencian, migran y se fusionan formando miofibras. Modificado de Abmayr and Pavlath, 2012 y Pasut et al., 2013.

Para mantener el cultivo en condición de proliferación se agregó *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2, por su sigla en inglés) 1nM. Si se quiere inducir la diferenciación de las células se deja de agregar FGF-2. Para eliminar células en proliferación se ocupó citosina β -D-arabinofuranosida (AraC) 0,1 mM (CalBiochem) por 48 horas. (Olguin and Olwin, 2012).

3.1.3 Cultivo de Fibras

Las fibras musculares, mantienen adheridas sus CS y permiten estudiarlas en un microambiente similar al fisiológico en estadios temprano ya que existen diferencias entre modelos *in vitro* e *in vivo* con respecto a la expresión génica de los marcadores clásicos de células satélites y su progresión miogénica (Pallafacchina et al., 2010) debido esencialmente a la carencia del nicho en condiciones *in vitro*.

Para la obtención de miofibras, se disectaron músculos EDL y fueron incubados en tubos cónicos con colagenasa tipo II (Worthington 265u/mg) por al menos 45 minutos. En seguida, se vertieron los tubos en placas con medio F12-C y utilizando pipetas Pasteur, se bombeó medio de cultivo hacia el músculo con tal de disgregar la mayor cantidad de fibras posibles (figura 3).

Finalmente, con una pipeta Pasteur, se fueron succionando las fibras y sembrando en placas de cultivo sin gelatina en medio de cultivo F12-C suplementado con 15% de SC y se agregó FGF-2. (Cornelison and Wold, 1997; Pasut et al., 2013).

Experimentos con fibras de EDL, se llevaron a cabo luego de 48 horas de cultivo. Finalizado este tiempo, se tomaron imágenes de quince fibras recién extraídas, midiendo cinco diámetros a lo largo de la fibra, utilizando el programa ImageJ® para las fibras control y las tratadas con Ang-(1-7).

3.2 Anticuerpos

3.2.1 Anticuerpos Primarios

Blanco	Origen	Dilución	Técnica	Marca
BrdU	Rata	1:200	IFI	AbCam®
GAPDH	Ratón	1:20000	WB	Millipore®
ki67	Ratón/Conejo	1:200 / 1:250	IFI	BD Pharmingen® / Abcam®
MHC (MF20)	Ratón	1:5 / 1:100	IFI/WB	Hibridoma Bank®
Miogenina (F5D)	Ratón/Conejo	1:5 / 1:100	IFI	Hibidoma Bank®
MyoD	Rata	1:100	IFI	Merck Millipore®
Pax7	Ratón	1:5	IFI	Hibridoma Bank®
Tubulina	Ratón	1:100	WB	Sigma-Aldrich®

3.2.2 Anticuerpos Secundarios

Blanco	Origen	Dilución	Técnica	Marca
HRP	Rábano	1:5000	WB	Cell Signalling®
IgG	Conejo	1:500	IFI	Invitrogen®
IgG	Ratón	1:500	IFI	Invitrogen®
IgG	Rata	1:500	IFI	Invitrogen®

3.3 Tratamientos de CS activadas con Angiotensina 1-7

Cabe destacar que una vez obtenidas las CS, debido al tratamiento para aislarlas, muchas de ellas se activan por lo cual de aquí en adelante se hará referencia a células satélites activadas o mioblastos primarios cuando se hable de cultivo primario de CS. Estas células se cultivan en las condiciones descritas sobre cubre-objetos tratados con gelatina al 0,66%. Se incuban en concentraciones crecientes de Ang-(1-7) (0-100 nM), de acuerdo a lo descrito en (Morales et al., 2014), a diferentes tiempos de incubación y en condición de proliferación (0-48 horas) o diferenciación (96 horas). En algunos experimentos de proliferación se usó el marcador molecular BrdU 10µm durante el cultivo celular por 24 horas. Luego las células se mantuvieron en condición de crecimiento hasta completar 72 horas de cultivo.

En otro experimento, se utilizó una cámara digital conectada a un microscopio de cultivo para obtener imágenes de las células en la medida que progresaba el tiempo. Los mioblastos primarios fueron crecidos por un día y luego tratados con Ang-(1-7) durante 24 horas y entonces se fijaron a las 48, 72 y 96 horas de cultivo.

3.4 Inmunofluorescencia Indirecta en mioblastos aislados de músculo y de fibras

Una vez culminado el tratamiento experimental, las células fueron lavadas con PBS y fijadas por 20 minutos en PBS- PFA al 4%. Luego se lavaron con PBS, permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% por 5 min y lavadas con PBS. Finalmente, se bloquearon por 20 minutos con solución de bloqueo PBS-BSA al 3%. En el caso de las fibras, estas se traspasan una a una al portaobjeto Superfrost® en el cual se dibujó con un lápiz hidrófobo para tinciones, el espacio donde se realizaron las IFI según la descripción anterior. Las imágenes se visualizaron en el microscopio de epifluorescencia Motic® BA410 y el análisis de ellas se realizó en los programas informáticos ImageJ e Image Pro® Plus 6.0, analizando el número de células, índice de proliferación e índice de fusión, definido como número de células asociadas a miotubos (NaM) (mayor a 2 núcleos), según corresponda y morfología de miotubos.

La incubación con el anticuerpo primario, se realizó por 2,5 horas a temperatura ambiente en una cámara oscura húmeda y posteriormente se hicieron lavados con la solución de bloqueo. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó por 1,5 horas, en las condiciones previamente descritas.

3.5 Extracción y cuantificación de proteínas totales y Western Blot

Para asegurar que el péptido Ang-(1-7) estuviese activo, se evaluó su efecto en miotubos diferenciados en células C2C12 de acuerdo al trabajo de Cisternas et al., 2015. Se realizó extracción de proteínas totales, y cuantificación de éstas mediante Western Blot. La cuantificación de proteínas totales se efectuó según el método Micro BCA (Pierce-Thermo®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El western blot (WB) se realizó según se ha descrito (Renart et al., 1979) Brevemente, la electroforesis de proteínas se llevó a cabo en condiciones desnaturantes en geles de poliacrilamida al 10% y posteriormente se llevó a cabo la electro-transferencia de proteínas a una membrana de PVDF. Los sitios inespecíficos de la membrana se saturaron con solución de bloqueo y se incubaron con los anticuerpos monoclonales contra MHC y miogenina, y luego los policlonales; tubulina y GAPDH, según sea el caso como control de carga o disueltos en solución de bloqueo.

3.6 Softwares

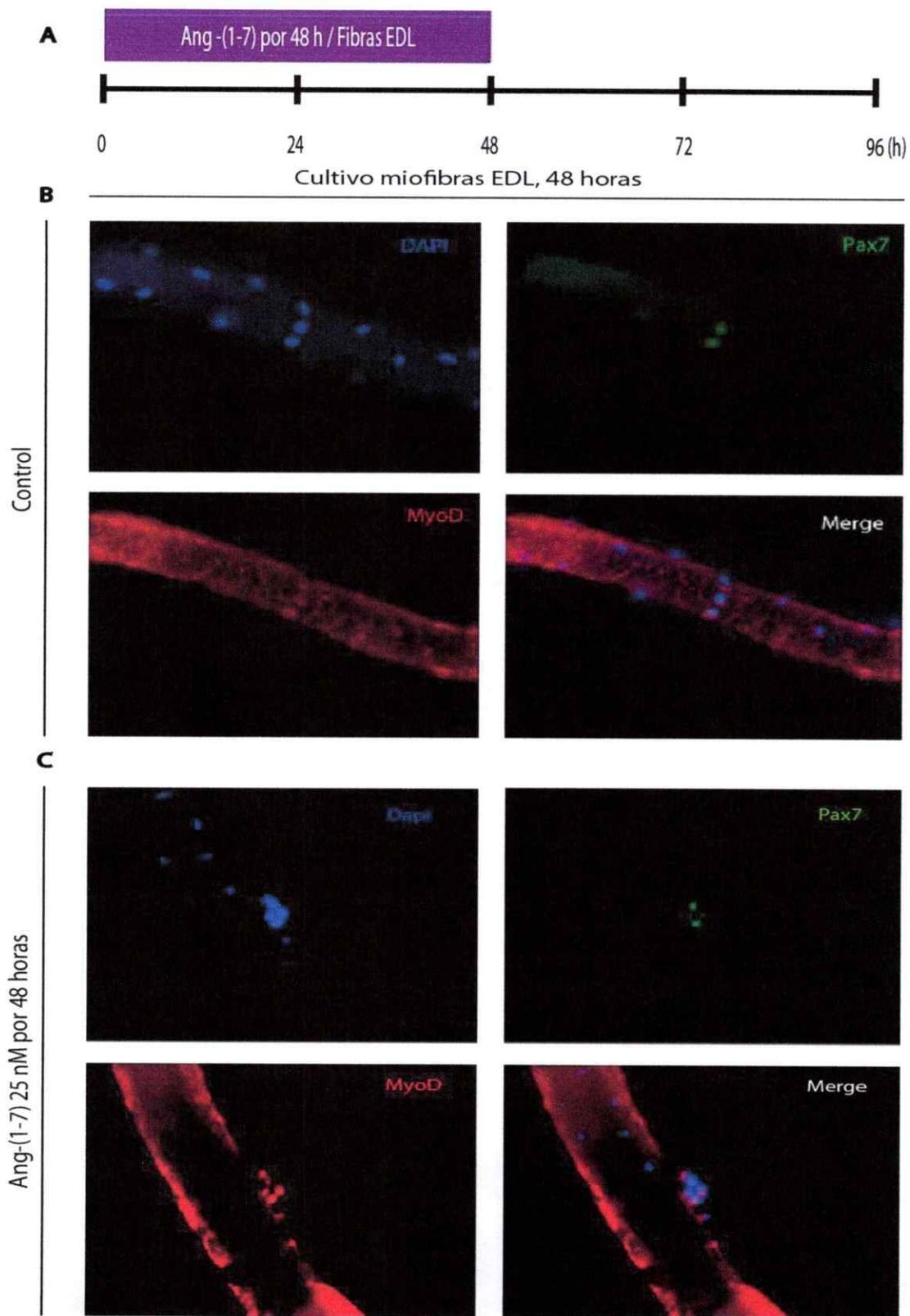
Para el procesamiento de imágenes, se utilizaron los programas ImageJ, Adobe Photoshop CS6 y Adobe Illustrator CC. En las IFI en que se usó cubre-objetos cuadrado de 22 mm de lado, el que se dividió virtualmente 4 partes iguales y se tomaron dos microfotografías para cada división. Cuando se usaron cubre-objetos redondos de 18 cm de diámetro, se dividió virtualmente en 9 partes iguales y se tomó una microfotografía por cada parte. Para la realización de gráficos y análisis estadísticos se usó el programa GraphPad Prism®.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de Ang-(1-7) sobre CS asociadas a miofibras de EDL en cultivo

Miofibras extraídas del músculo EDL de ratón adulto, fueron cultivadas y tratadas de acuerdo a la **figura 4A**, para luego evaluar el efecto de Ang-(1-7) sobre la activación de CS mediante IFI (**figura 4B, C**).

En este experimento se observó un incremento del número de células que co-expresan Pax7 y MyoD (~50%) en la condición tratada con Ang-(1-7) respecto del control (**figura 4D**). Sumado a esto, también hubo un aumento en el porcentaje de células que solo expresan MyoD; mientras que el número total de CS prácticamente no varía (**figura 4B**). Por lo tanto, de este experimento se puede destacar que Ang-(1-7) estimuló tempranamente un compromiso miogénico de las CS con respecto al control sin tratamiento, lo cual refuerza la hipótesis de que Ang-(1-7) estimula la capacidad miogénica de las CS.



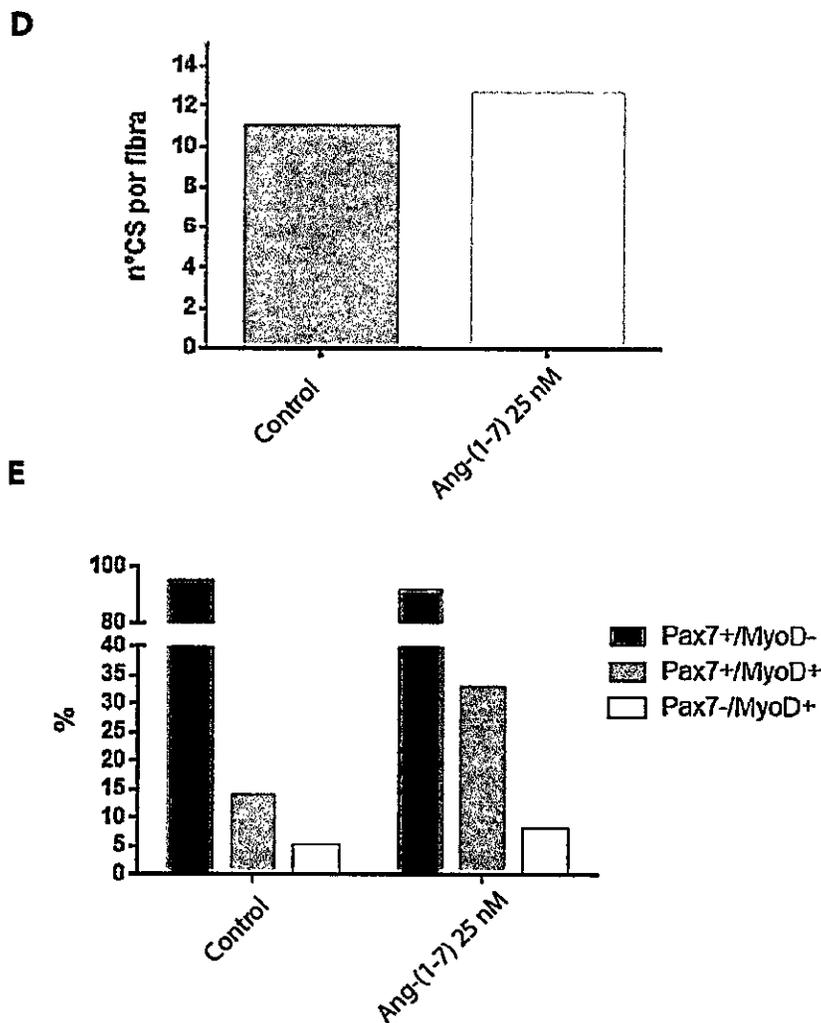


Figura 4. Ang-(1-7) incrementa la población de CS Pax7+/MyoD+ en miofibras de EDL. **A.** Miofibras de EDL se dejaron en cultivo por dos días con y sin Ang-(1-7). **B.** Inmunofluorescencia de fibras control tras dos días en cultivo. **C.** Inmunofluorescencia de fibras tratadas con Ang-(1-7) 25 nM durante dos días. **D.** El número de CS por fibra se mantiene prácticamente invariable. **E.** Mientras que el porcentaje de células marcadas con Pax7 y MyoD se duplica, denotando un mayor compromiso miogénico de las CS. Como total de CS, se consideró la suma de CS totales por fibra, sumando las que tuvieron marca Pax7+ o MyoD+. Finalmente, la subpoblación de células que solo expresó MyoD, también se vio incrementada con el tratamiento 25nM de Ang-(1-7). Este grupo celular, dejó de expresar Pax7, comprometiéndose hacia la diferenciación.

Al extraer fibras del músculo EDL de ratón adulto, estas fueron analizadas desde su extracción hasta 48 horas después para evaluar cambios en el diámetro promedio en cultivos tratados con Ang-(1-7) 25 nM o vehículo.

El resultado obtenido se muestra en la **figura 5A-B** y da cuenta como el diámetro de las miofibras disminuyó en mayor proporción en los cultivos controles respecto a los cultivos tratados con Ang-(1-7). En ellos, se observó claramente como una subpoblación de fibras mantiene su diámetro -como si hubiesen sido recién extraídas- luego de 48 horas de cultivo. Cabe mencionar, que las fibras analizadas inmediatamente post extracción, exhibieron una baja dispersión en el diámetro promedio (datos no mostrados), lo que implica una cierta uniformidad en torno a este parámetro. Sin embargo, con el paso de tiempo en cultivo, el diámetro disminuyó (entre 10 y 15%).

Por otro lado, las miofibras tratadas con Ang-(1-7) 25 nM, tuvieron una dispersión de datos mucho mayor que los obtenidos en cultivos control. En ese sentido, se definieron dos sub poblaciones (P1 y P2) la primera de menor diámetro que la mediana obtenida y la segunda de diámetros mayor que la mediana e incluso mayor que la mediana de fibras recién extraídas (**figura 5C**). Esta figura, representa una mirada alternativa de la **figura 5B**; se muestra una curva de los porcentajes de las frecuencias con que se repiten mediciones de diámetro de las fibras en determinados rangos calculados de acuerdo a los datos obtenidos. La curvas verde y roja, muestran la distribución de fibras control y tratadas con Ang-(1-7) 25 nM, respectivamente. De acuerdo a esto, la curva roja se desplaza levemente hacia diámetros mayores, notándose dos máximos, que marcan claramente las dos poblaciones de fibras descritas a partir de la **figura 5B**. De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos con miofibras, se observó que Ang-(1-7) tiene un efecto sobre las CS adheridas a miofibras, incrementando su activación y por otra parte afectan a las miofibras manteniendo su diámetro promedio en cultivo con respecto al control.

A

Cultivo primario de miofibras de EDL, 48 horas

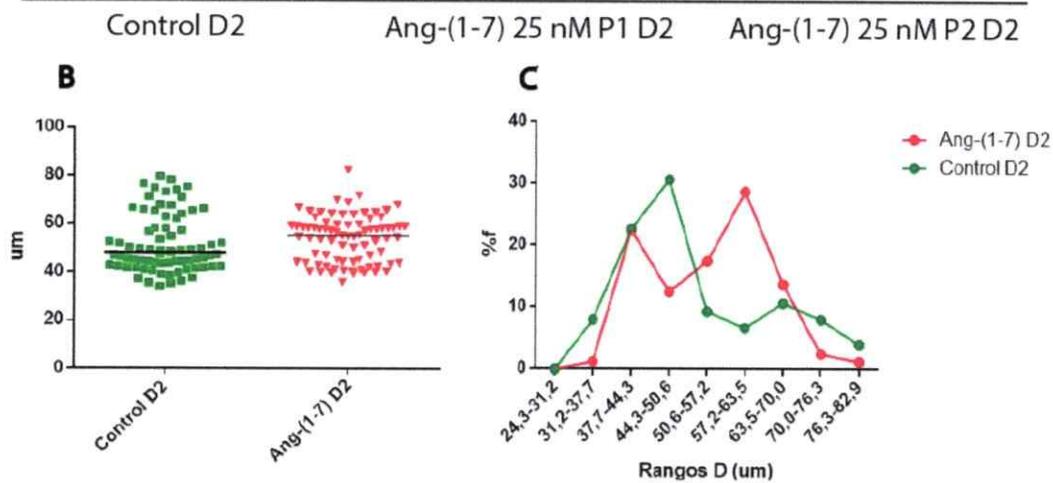
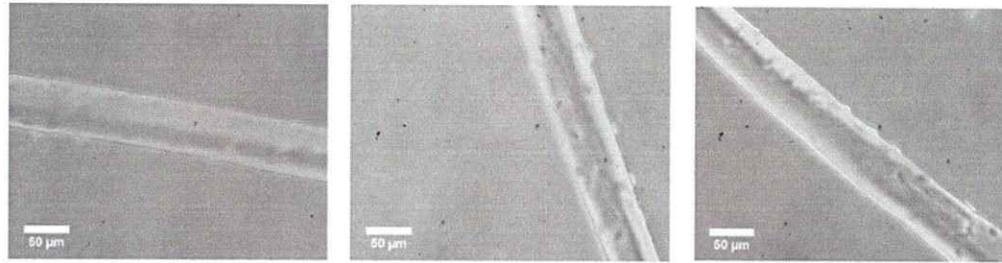


Figura 5. Ang-(1-7) establece dos poblaciones de miofibras de EDL en cuanto a su diámetro y evita el decrecimiento natural de este. Rangos D: Rangos diámetros. D2: D: día 2. **A.** En la figura se muestran fibras de EDL vivas en condición control y tratadas con Ang-(1-7) 25 nM, luego de dos días de cultivo (D2). Se observaron dos subpoblaciones de fibras P1 y P2 de diámetro menor y mayor respectivamente. **B.** Si bien en forma natural el diámetro de las fibras disminuye con el paso del tiempo, el tratamiento con Ang-(1-7) durante los dos días de cultivo, mostró que el diámetro no decrece de la misma forma en todas las fibras. Es más, se formaron dos subpoblaciones de fibras (P1 y P2) que indican miofibras de diámetro menor y mayor de acuerdo a la distribución de los datos, respectivamente. **C.** Rangos D: Rangos Diámetros de fibras EDL. De acuerdo a la distribución de frecuencia de los diámetros, se observa un corrimiento de la curva roja (Ang-(1-7) 25 nM D2) hacia rangos de diámetros mayores con respecto a la verde (Control D2) Además se pone en evidencia nuevamente la existencia de las subpoblaciones P1 y P2, ya que denotan dos picos en la curva del el tratamiento con Ang-(1-7) (n=4, experimento representativo).

4.2 Ang-(1-7) incrementa el número de células totales y estimula la diferenciación de CS aisladas de músculo de ratón adulto

Como primera aproximación, se determinó qué efecto tiene Ang-(1-7) sobre la diferenciación terminal de precursores musculares en cultivo. Para ello, se sembraron mioblastos primarios en placas de 6 pocillos y se agregó Ang-(1-7) en concentraciones crecientes (0, 1, 10, 50, 100 nM) durante 6 horas y posteriormente se dejaron hasta el quinto día de cultivo de acuerdo a la **figura 6A**. En este caso, se evaluó la cantidad de núcleos totales y el índice de fusión.

En la **figura 6B** se muestra una microfotografía de campo claro del experimento en que se observó una mayor cantidad de núcleos (marcados con DAPI) asociados a miotubos, lo que equivale a un aumento en el índice de fusión respecto al control (se consideró como miotubo, la fusión de más de dos núcleos). Este aumento, se manifestó de manera dosis-dependiente respecto a la concentración de Ang-(1-7) (**figura 6B, C, D**). Este efecto correlacionó con un aumento del número de núcleos totales en casi dos veces -en el rango 0-50 nM de Ang-(1-7)- relativo al control (**figura 6B,C**). El efecto alcanzó una meseta entre los 50 y 100 nM, manteniéndose por sobre el nivel del control.

Por lo tanto, el resultado de este experimento mostró que Ang-(1-7) afectó directamente a los mioblastos, incrementando el número total de núcleos y su fusión relativo al control, lo que implica que Ang-(1-7) estimula su capacidad miogénica.

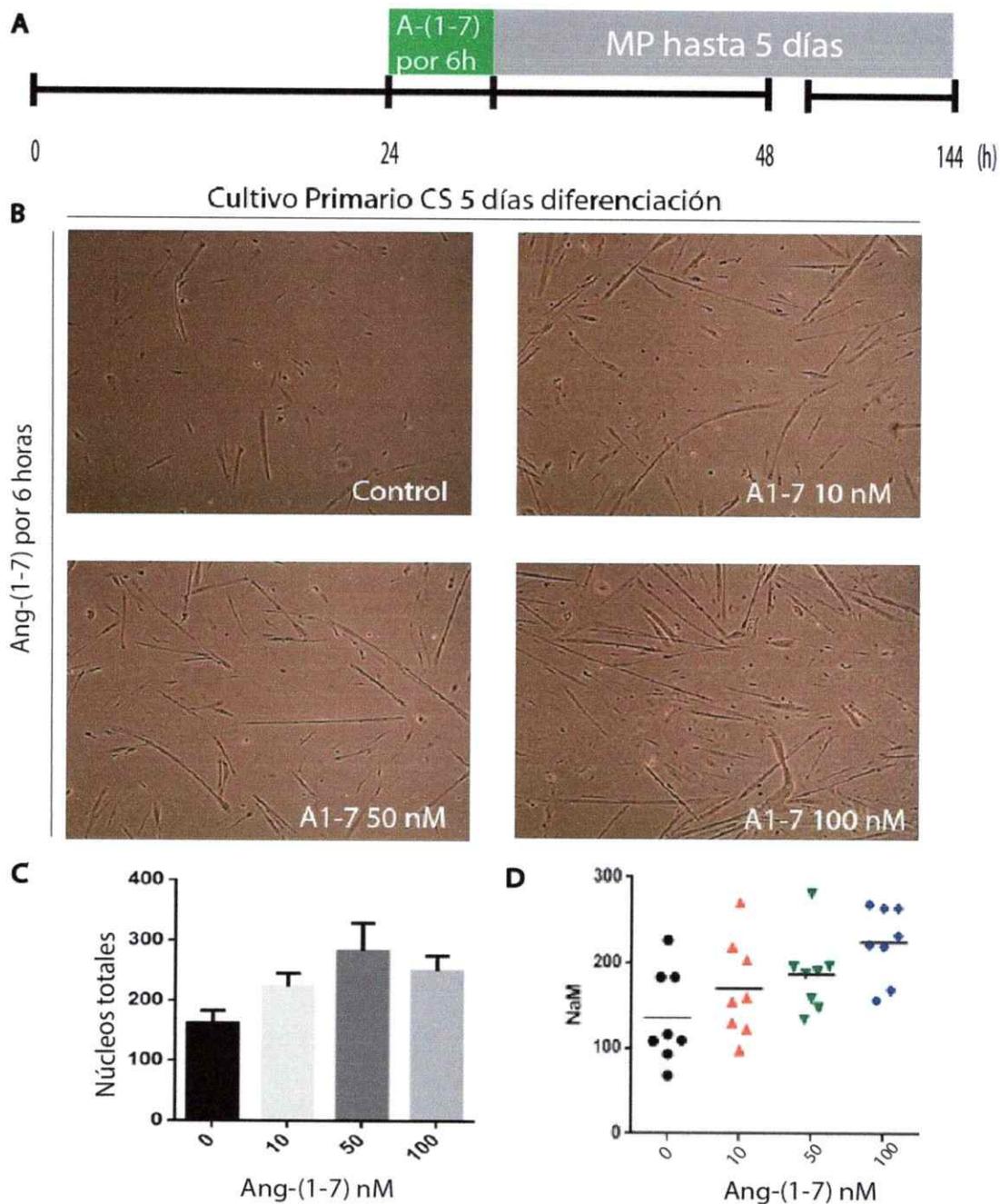


Figura 6. Ang-(1-7) incrementa el número de células totales y la fusión de mioblastos primarios. NaM; núcleos asociados a microtubulos. MP; mioblastos primarios. **A.** MP tratados con Ang-(1-7) por 6 h (barra verde). Cambio a medio de diferenciación a las 48 h. Mantenimiento durante 5 días (barra gris) y fijación con PFA 4% en PBS. **B.** Mioblastos primarios de ratón tratados con Ang-(1-7). **C.** En el gráfico, se observó un aumento del número de células totales, lo que sugiere un incremento en proliferación. **D.** Por otra parte, se puede notar un incremento en la mediana de núcleos asociados a microtubulos, lo que podría dar cuenta de un aumento de la fusión (n=1).

4.3 Incremento de dosis y tiempo de incubación con Ang-(1-7) estimula la proliferación tempranamente y en mayor medida la diferenciación de mioblastos primarios

4.3.1 Ang-(1-7) estimula la proliferación de CS aisladas de músculo de ratón adulto y de la línea celular de mioblastos C2C12 de manera diferencial.

Para evaluar efecto de Ang-(1-7) sobre la proliferación de mioblastos primarios, se cultivaron mioblastos primarios en placas de 12 pocillos. Al día siguiente se incubaron con Ang-(1-7) por 6 horas y se fijaron a las 48 horas de acuerdo a la **figura 7A**. Finalmente, se realizó una doble IFI para los marcadores Ki67 -que permite detectar las células que están en mitosis, G1, o G2 del ciclo celular- y Pax7 como marcador de CS.

En primer lugar, se observó un aumento de núcleos totales por campo, en el rango de concentración entre 0,1 y 10 nM de Ang-(1-7) (**figura 7B, C**). En segundo lugar, el porcentaje de células positivas para el marcador Ki67 aumentó con el tratamiento de Ang-(1-7), lo que coincide en el rango de concentración en que se observó un mayor marcaje de Pax7 (1 nM).

Considerando el resultado previo, se evaluó si el heptapéptido tenía un efecto sobre la proliferación de la línea celular C2C12 de mioblastos que tienen un tiempo de duplicación más corto que los mioblastos primarios. Estas fueron cultivadas durante 24 horas, para posteriormente agregar Ang-(1-7) durante 6 horas y fijar el cultivo a las 48 horas, de acuerdo a la **figura 8A**. Finalmente se realizó una doble IFI para detectar los marcadores Ki67 y Pax7.

Al igual que en el experimento anterior, se observó un aumento en el total de núcleos (**figura 8B, C**), acompañado de un incremento del porcentaje de células con el marcador de proliferación ki67 que fueron tratadas con Ang-(1-7) (0,1 y 1 nM).

Además, se observó que la mayor parte de células marcadas con ki67 también co-expresaron Pax7 en el rango entre 0 y 1 nM. Lo anterior, también se observó en el modelo de mioblastos primarios, lo que apunta a que hubo un efecto a nivel de la proliferación de éstas cuando son tratadas con cantidades crecientes de Ang-(1-7).

Estos resultados, sugieren que en la línea C2C12, el rango en que se aprecia el efecto de Ang-(1-7) fue más restringido (0,1 y 1 nM), así como también la intensidad de este (veces de cambio). En términos de los objetivos de este trabajo, la proliferación se incrementó con Ang-(1-7) en ambos modelos celulares.

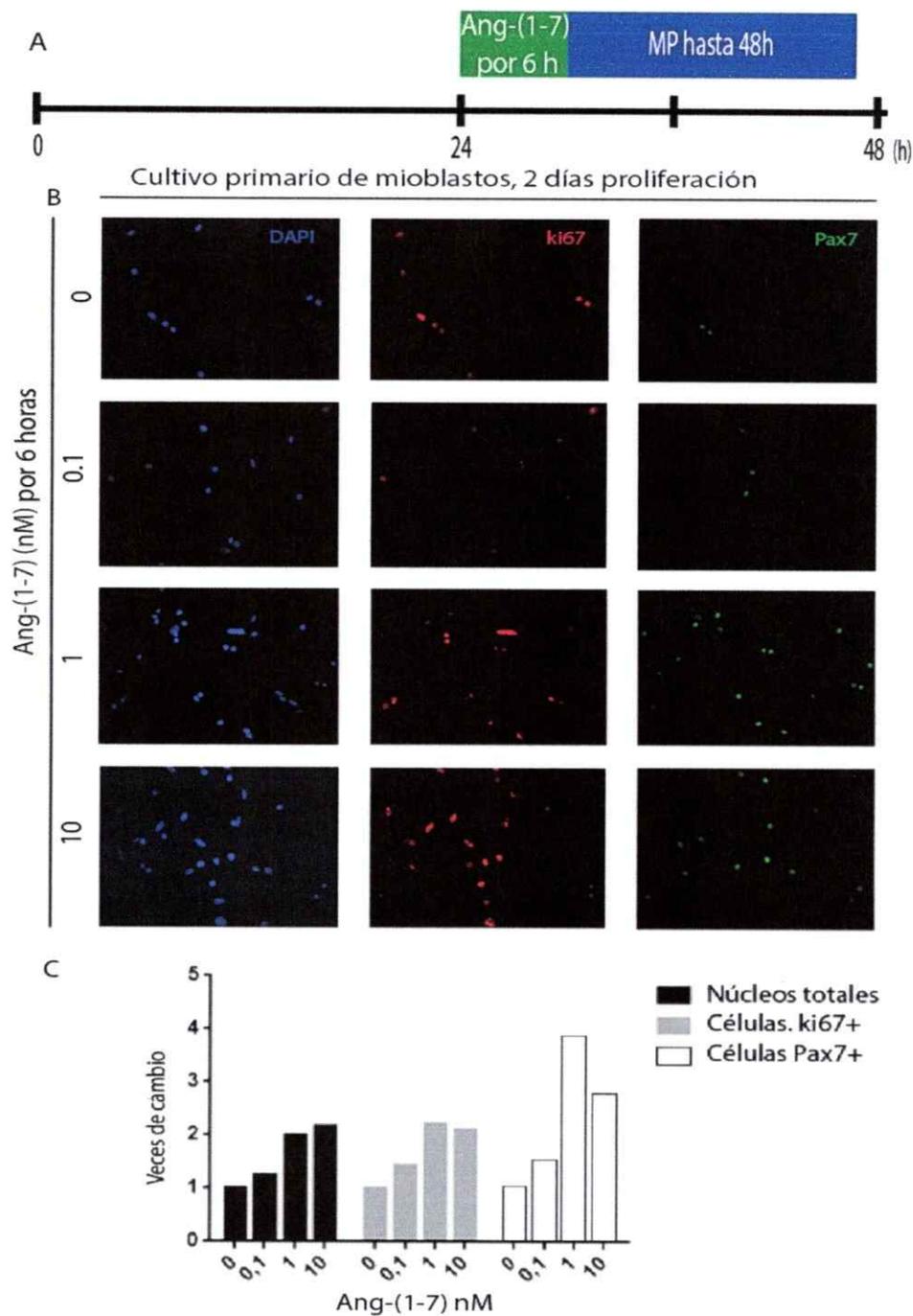


Figura 7. Tratamiento corto con Ang-(1-7) incrementa la proliferación de CS.

A. MP tratados con Ang-(1-7) por 6 horas y fijados a las 48 h de cultivo (barra azul). **B.** En este experimento, el tratamiento con Ang-(1-7) por 6 horas incrementó el número de núcleos por campo de forma dosis-dependiente. Inclusive, aumentaron las células marcadas como Pax7+/MyoD+, lo que indicaría una inducción en la proliferación en el rango de concentración 1-10 nM. **C.** La cuantificación mostró un incremento consistente en el número de células en cuanto al rango de concentración 1-10 nM en que se incubaron las células (n=1).

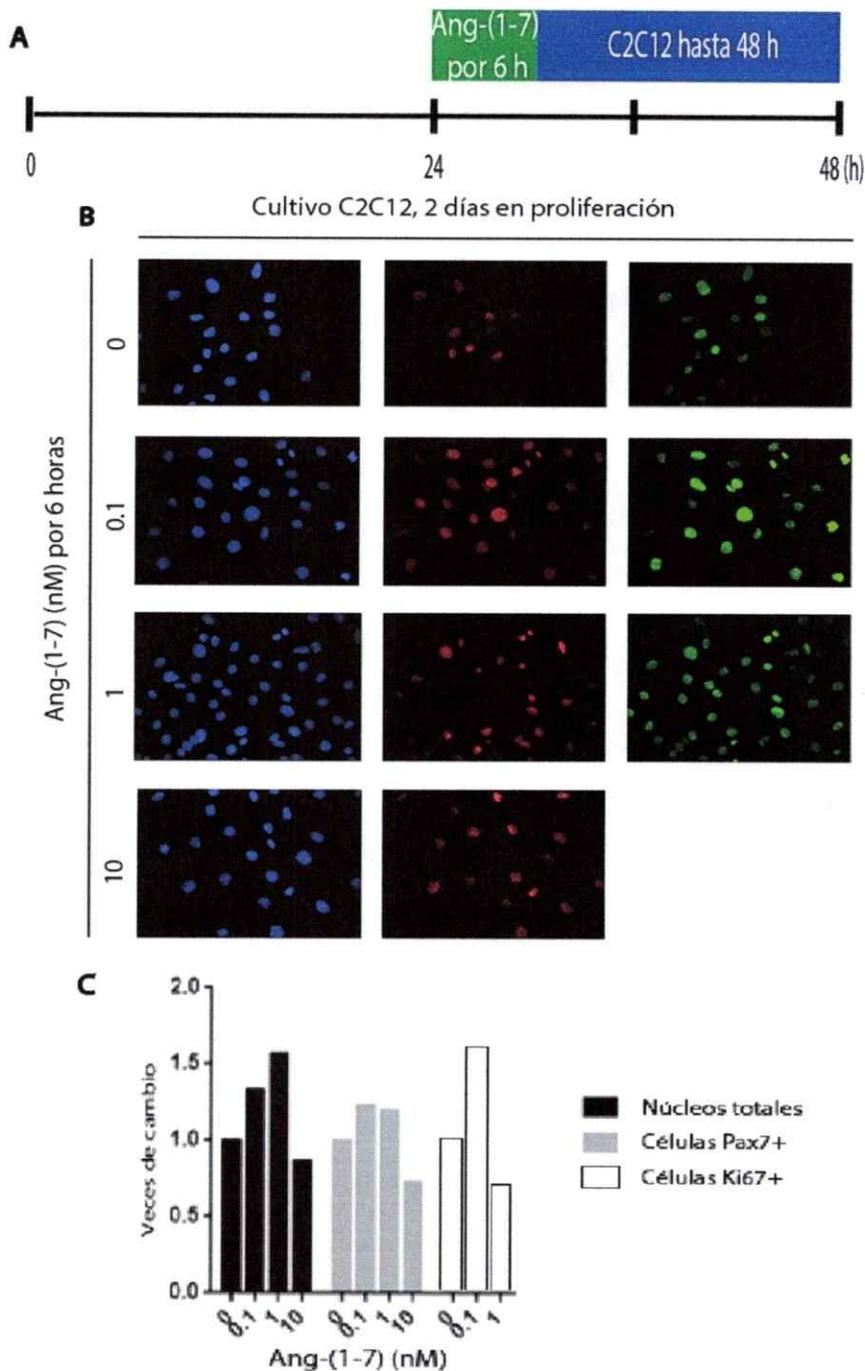


Figura 8. Tratamiento corto con Ang-(1-7) estimula la proliferación de células C2C12.

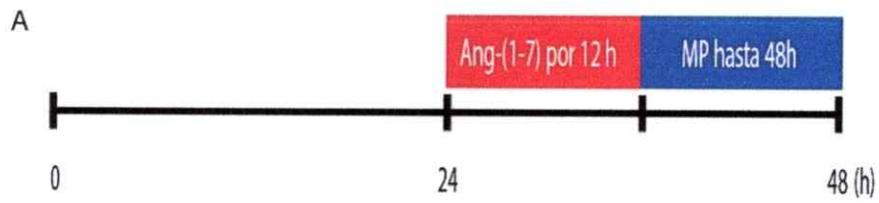
A. C2C12 tratados con Ang-(1-7) por 6 h y fijación a las 48 h de cultivo (barra azul). **B.** Células tratadas por 6 horas con Ang-(1-7) y fijadas a las 24 horas. **C.** La cuantificación, mostró un incremento dosis-dependiente en el número de células que expresan el marcador de proliferación ki67(n=1). Sin embargo, hay que notar que el rango de concentración activo y las veces de cambio de la respuesta fue distinto respecto al cultivo de mioblastos primarios. (**Fig. 7**)

4.3.2 Incremento del tiempo de incubación de Ang-(1-7) mantiene el efecto sobre la proliferación de células satélite aisladas de músculo de ratón adulto hasta las 24 horas

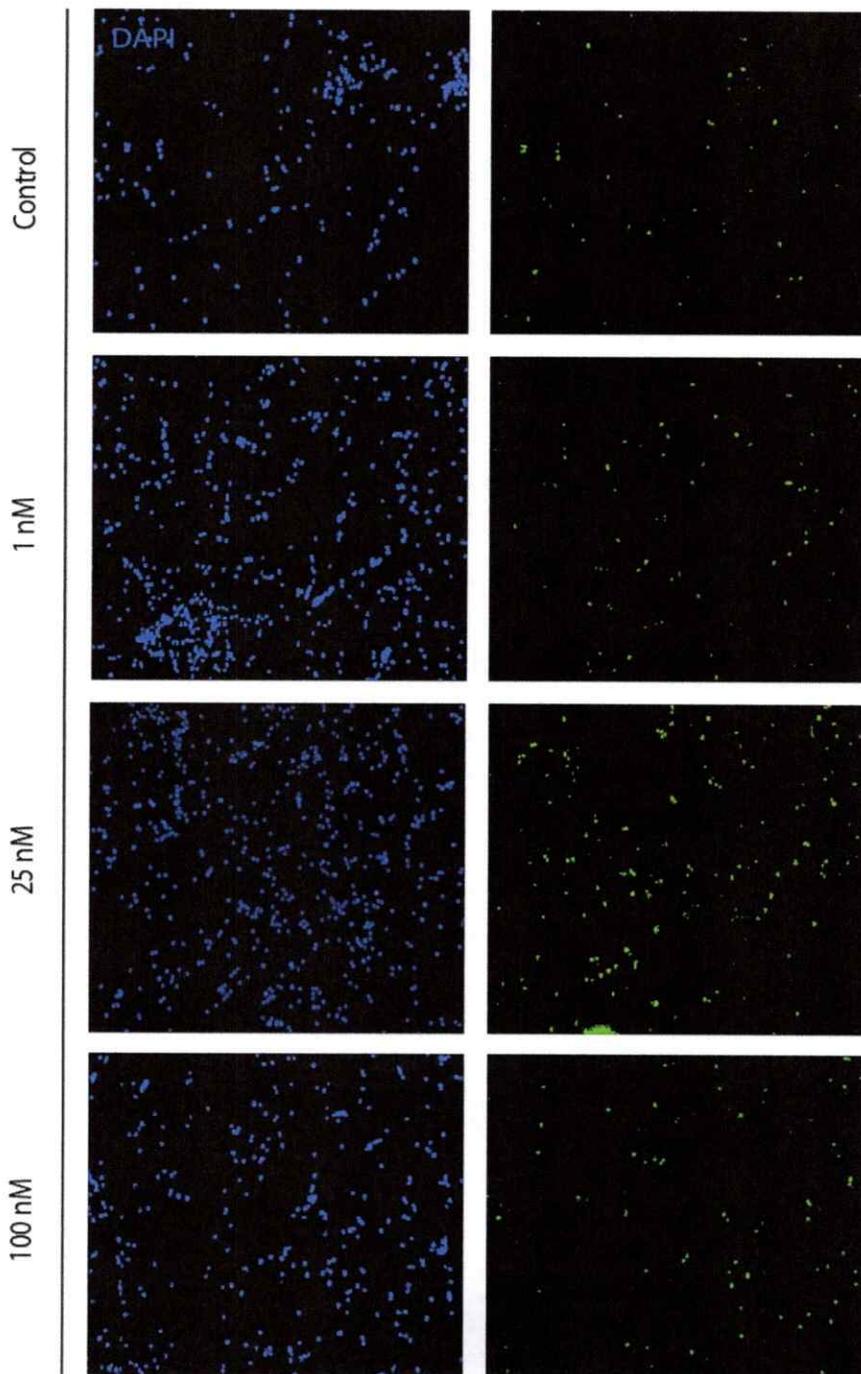
El efecto de Ang-(1-7) en CS puede alterarse al exponer las células durante un mayor tiempo al péptido y, además, mioblastos en cultivo liberaran señales de acción auto/paracrina que pueden alterar el/los efecto(s) de Ang-(1-7) de acuerdo a ese tiempo de exposición.

Cultivos de mioblastos primarios fueron incubados en presencia de concentraciones crecientes de Ang-(1-7) (1-100nM) por 12 horas y fueron fijados a las 48 horas, de acuerdo a la **figura 9A**. Se realizó una IFI para ki67. En estas condiciones, se determinó que el número de núcleos totales se incrementó al doble respecto al control cuando se trataron los mioblastos con Ang-(1-7) (1nM). Este aumento se observó para la concentración 25 nM; no hubo cambios entre el control y el tratamiento con Ang-(1-7) 100 nM (**figura 9B-C**). Además, el porcentaje de células positivas para ki67 se incrementó en un 10% para el todo el rango de concentraciones testeadas en los experimentos realizados (1-100 nM) (**figura 9B-D**). Respecto a los ensayos anteriores, al incrementar el tiempo de exposición a Ang-(1-7), se redujo el aumento de la proliferación en mioblastos primarios, lo cual fue similar a lo ocurrido en la línea celular C2C12.

Por lo tanto, mioblastos primarios incubados con Ang-(1-7) por 12 horas, aumentó el número de núcleos totales y levemente la proliferación de mioblastos primarios, lo que de todas formas se condice con los experimentos anteriores.



B Cultivo primario de mioblastos, 2 días proliferación



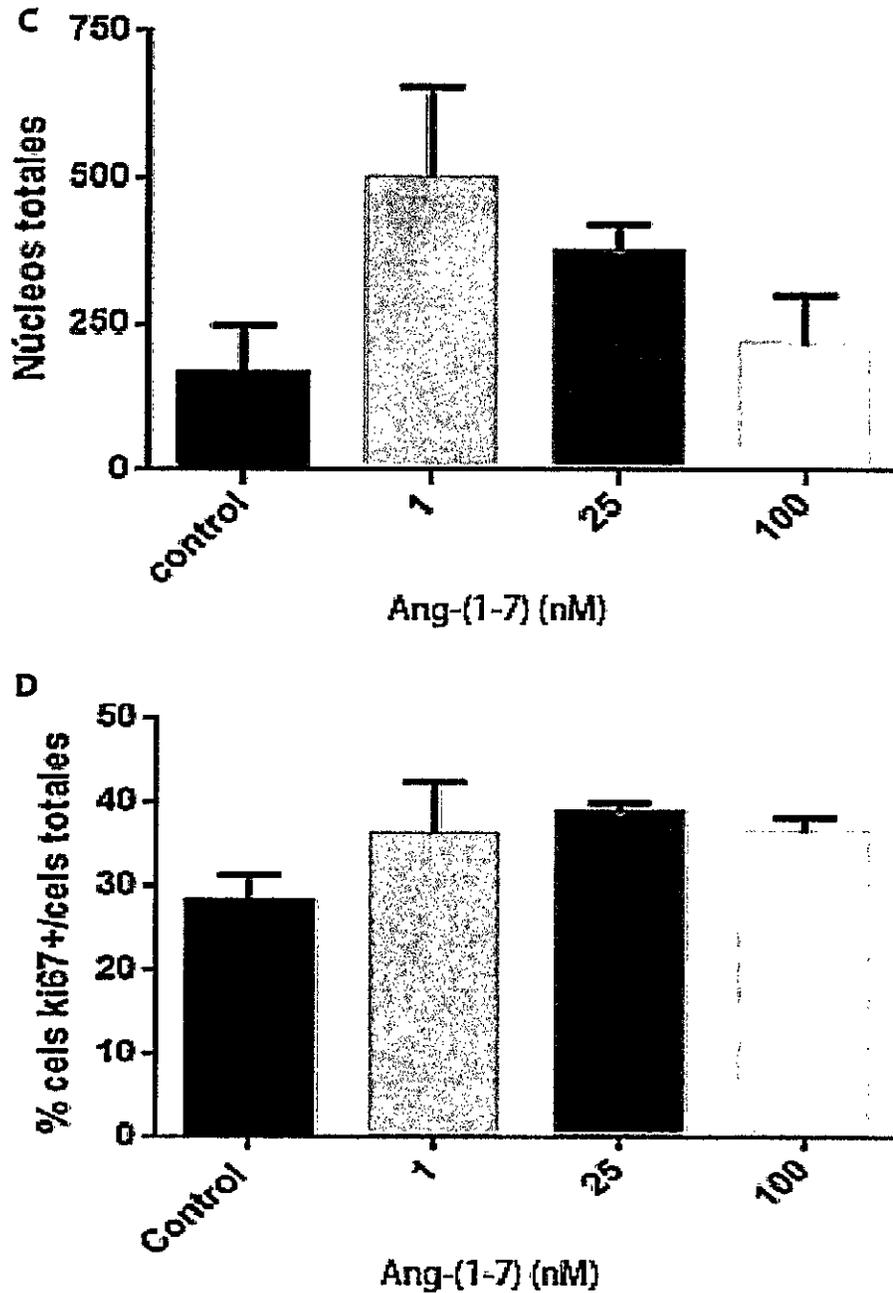


Figura 9. Angiotensina 1-7 Incrementa la proliferación de mioblastos primarios
A. MP tratados con Ang-(1-7) por 12 horas y fijados a las 48 h de cultivo (barra azul) **B.** Cultivo primario de mioblastos, incubados por 24 horas, fueron tratados con Ang-(1-7) durante 12 horas y fijados a las 48 horas en condición de proliferación. **C.** En este experimento se observó un incremento dosis-dependiente del número de células por campo alcanzando un máximo para el tratamiento con 25 nM de Ang-(1-7) (n=2, experimento representativo). Además, se mostró un aumento en el porcentaje de células ki67+. en el rango 1-25 nM como se observa en **D.** (n=2, experimento representativo).

De acuerdo a las condiciones experimentales detalladas en la **figura 10A** en que las células se incubaron con Ang-(1-7) por un tiempo mayor (24 horas), se realizó una IFI para detectar Ki67 en el cultivo de 48 horas. Los resultados anteriores, mostraron que Ang-(1-7) incrementó el número de núcleos totales y el porcentaje de células ki67+. Esto planteó la idea de que los mioblastos podrían comenzar tempranamente a diferenciarse. En la **figura 10B** se muestra un aumento en la cantidad de núcleos totales con el tratamiento de Ang-(1-7) 25 nM por 24 horas. Por otra parte, el porcentaje de células marcadas con ki67 se mantuvo constante en el tratamiento con Ang-(1-7) relativo al control (**figura 10C**), sin embargo, hubo un mayor número de células marcadas con ki67 respecto al control, ya que en efecto hubo una mayor cantidad de núcleos totales, lo que indica que las células tratadas con Ang-(1-7) mantuvieron el incremento en la proliferación.

Por lo tanto, al evaluar diferentes dosis y tiempos de incubación de Ang-(1-7) en los experimentos descritos, se encontró un incremento en el número de mioblastos totales después de las 6 y 12 horas de incubación y en el porcentaje de proliferación. No obstante, en el experimento de 24 horas de incubación, este aumento pareció detenerse, al igual que la proliferación. Finalmente, en cuanto a las dosis de Ang-(1-7), el efecto sobre la proliferación fue dosis-dependiente hasta los 25 nM.

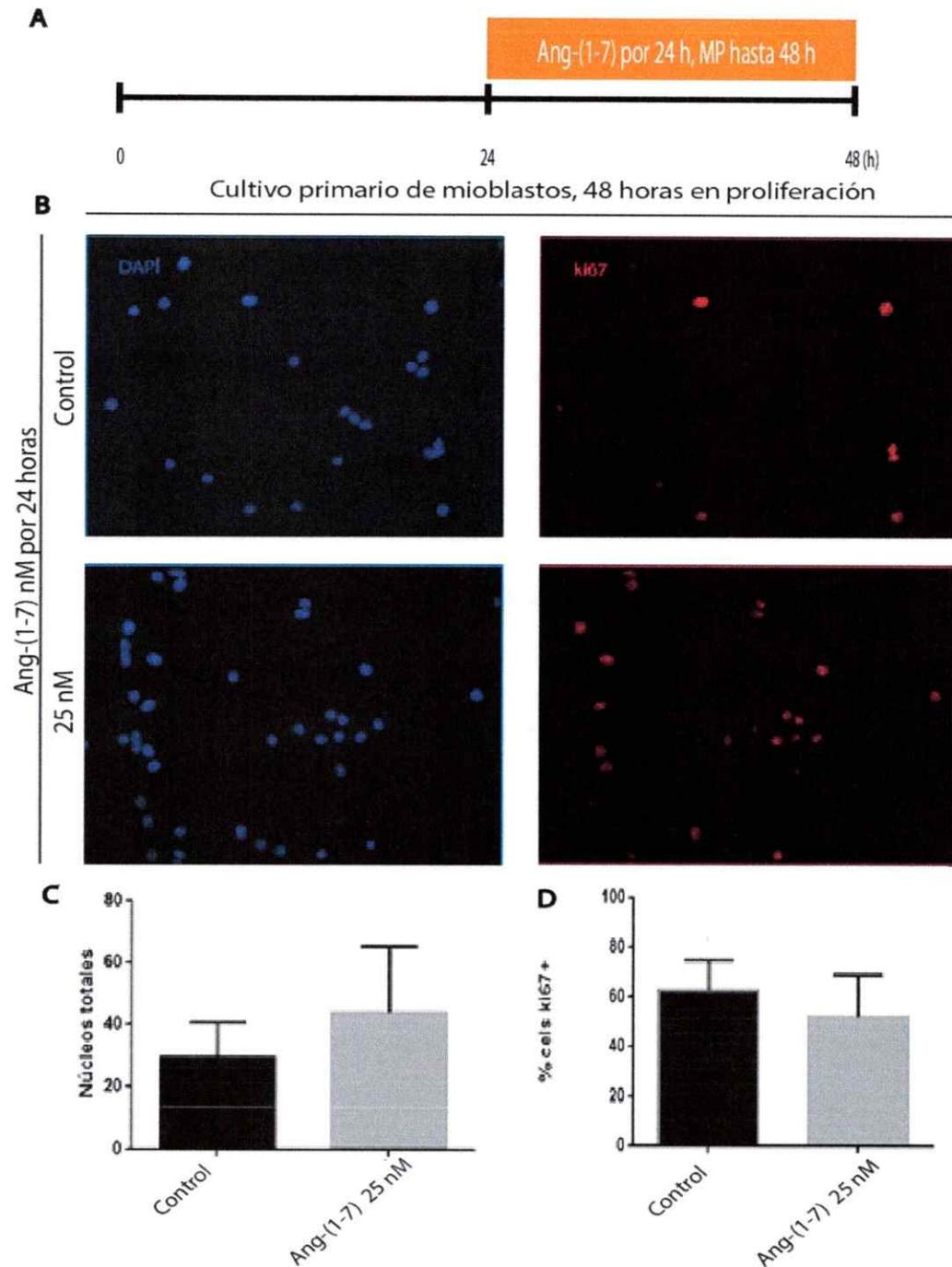


Figura 10. Tratamiento largo con angiotensina 1-7 incrementa el número de mioblastos primarios

A. IFI de mioblastos primarios control y tratados con Ang-(1-7) 25 nM durante las 24 horas finales del cultivo. **B.** En el gráfico se muestra que hay un incremento en los núcleos totales de mioblastos primarios tratados con Ang-(1-7) 25 nM del orden del 50% relativo al control **C.** Sin embargo, en estos experimentos no hay diferencias en las células ki67+ entre las células tratadas y no tratadas (n=2, experimento representativo).

4.3.3 Ang-(1-7) potencia la diferenciación de CS aisladas de músculo de ratón adulto

Habiendo evaluado el efecto de Ang-(1-7) en proliferación en varias concentraciones y tiempos de incubación por medio de marcadores moleculares, se evaluó cualitativamente la diferenciación por medio de la fusión de los mioblastos a 48, 72 y 96 horas, previa incubación con 25 y 100 nM Ang-(1-7) (**figura 11A**). En estas condiciones, fue posible determinar la formación de miotubos a las 48 horas, de forma dosis dependiente en los cultivos tratados con Ang-(1-7); no así en la condición control (**figura 11B**). Estas diferencias se mantuvieron en cultivos de 72 y 96 horas, siendo notoria la tendencia a formar miotubos de mayor tamaño (**figura 11B**).

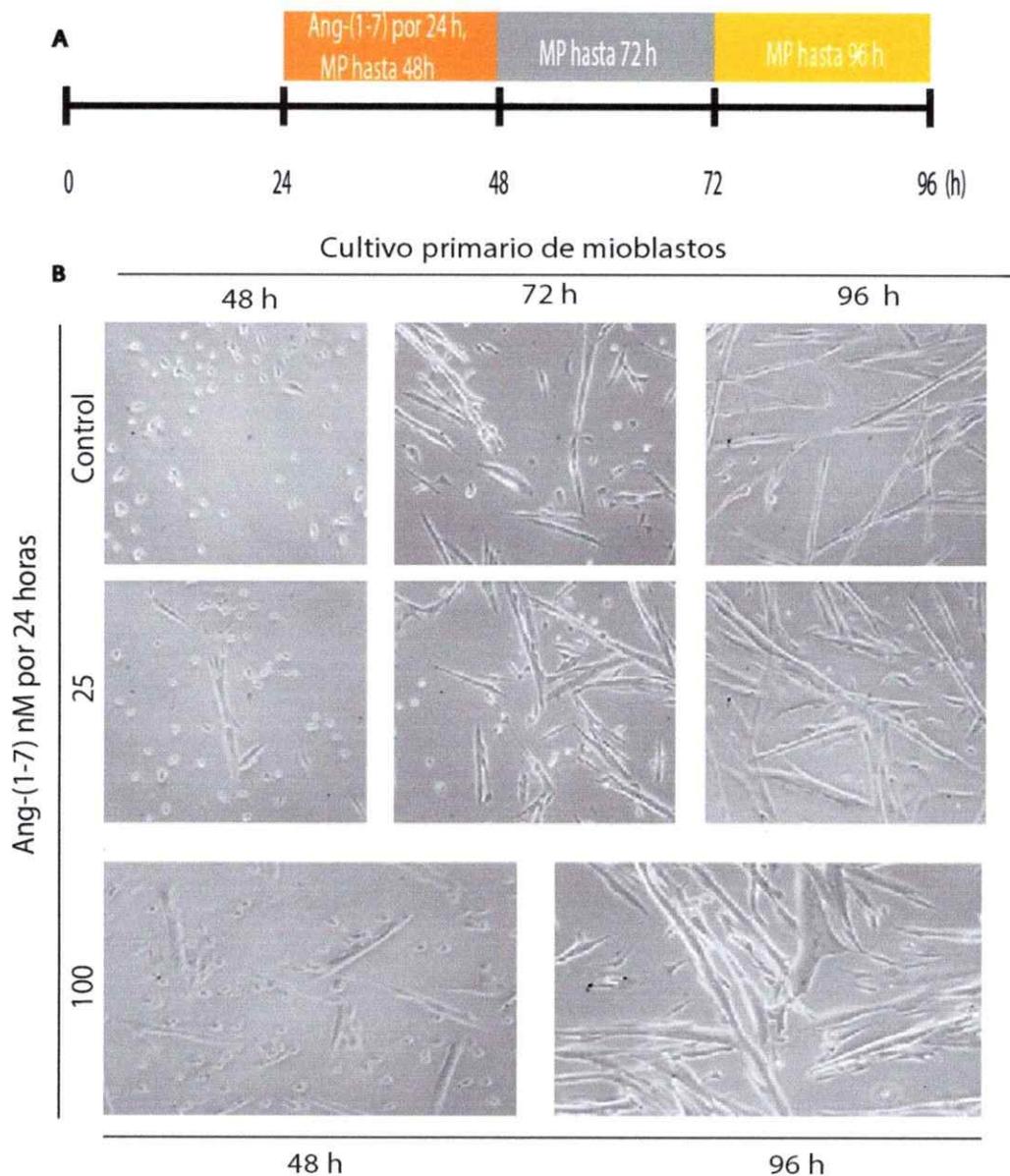
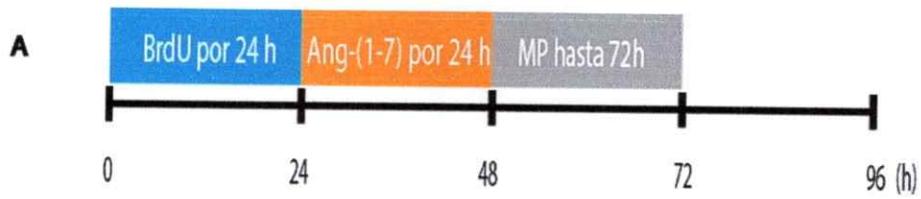


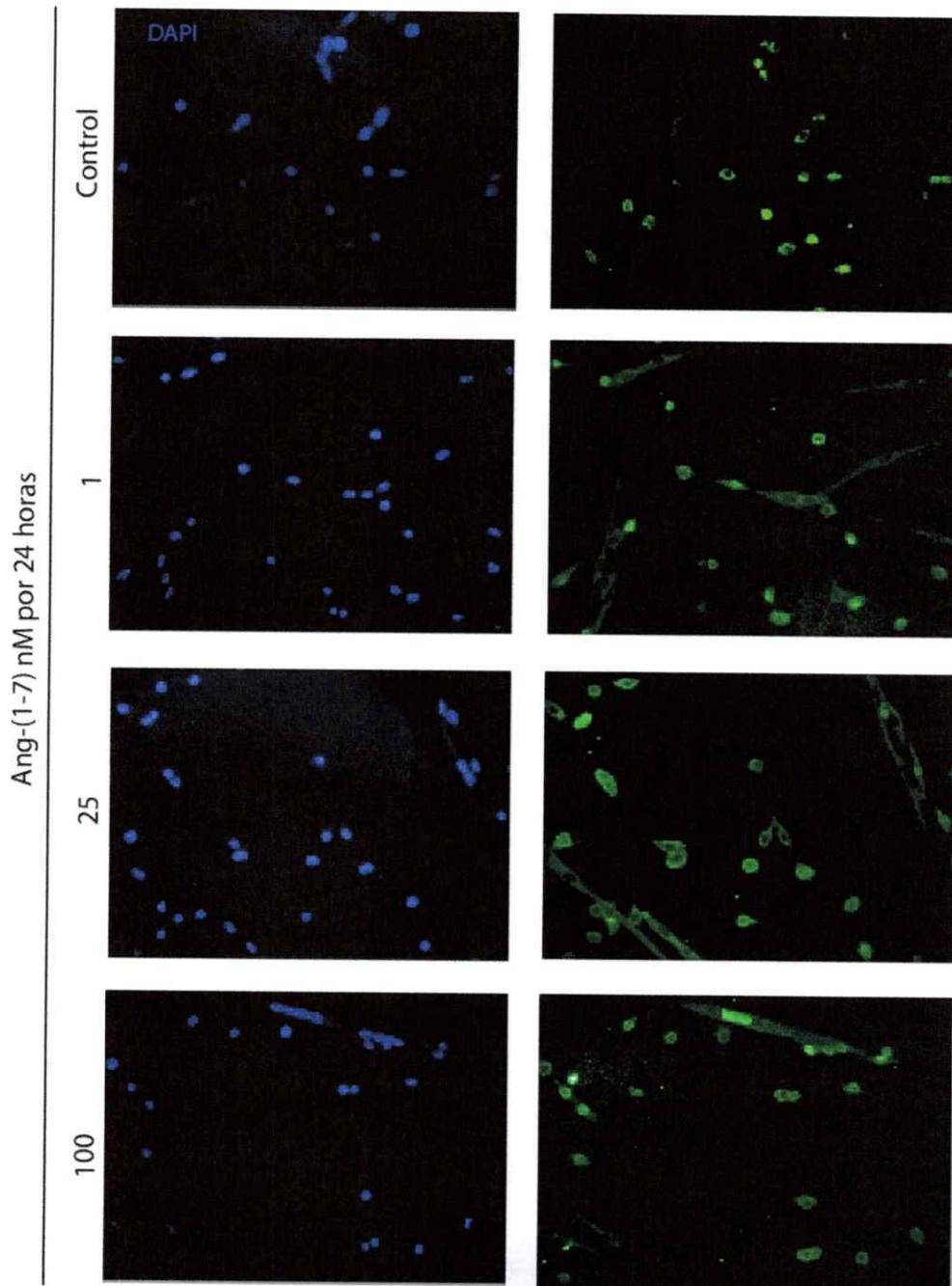
Figura 11. Ang-(1-7) estimula tempranamente la fusión de mioblastos primarios.

A. Cultivos de MP tratados con Ang-(1-7) durante 24 horas fueron fijados a las 48, 72 y 96 horas (barra naranja, gris y amarilla, respectivamente). **B.** En la figura se observó una temprana formación de algunos miotubos desde las 48 horas en cultivo, con respecto al control, sugiriendo una mayor eficiencia en el proceso de fusión. A las 96 horas, se pudo observar un gran nivel de fusión alcanzando a formarse grandes redes imbricadas de miotubos. Se sugiere una dosis-dependencia de Ang-(1-7) dado que la eficiencia de fusión se observó desde las 48 horas con 25 nM y 100 nM de Ang-(1-7), teniendo un mayor efecto esta última concentración.

De acuerdo al resultado anterior se realizó un experimento según lo descrito en la **figura 12A**, en que se utilizó BrdU para evaluar la dilución de la marca BrdU, mostró que los mioblastos hicieron una transición más rápida hacia la diferenciación con el tratamiento de Ang-(1-7) respecto a la situación control. El porcentaje de células fusionadas se incrementó en más de dos veces (30,14 % en el control y 65,5% en el tratamiento con Ang-(1-7) 100 nM. En particular, en esta ventana de tiempo, se siguieron las células que incorporaron BrdU inicialmente y cuál fue su destino. Las células que retuvieron la marca, podrían estar en G0 lo que explica el incremento en la formación de miotubos (**figura 12B-C**). Sin embargo, se requiere una estrategia que evalúe directamente el cambio de marcación en cada una de las etapas del ciclo celular. Además, en la **figura 12C** fue posible distinguir una mayor cantidad de núcleos asociados a miotubos que quedaron marcados con BrdU y que fueron tratados con 100 nM de Ang-(1-7) respecto al control, lo que potencia la idea que Ang-(1-7) estimula la diferenciación y fusión de los mioblastos.



B Cultivo primario mioblastos, 72 horas en proliferación



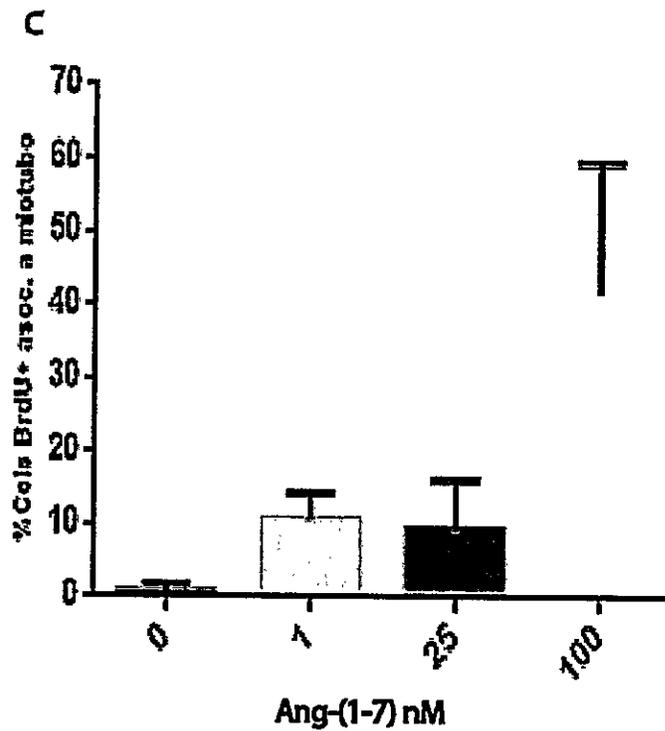


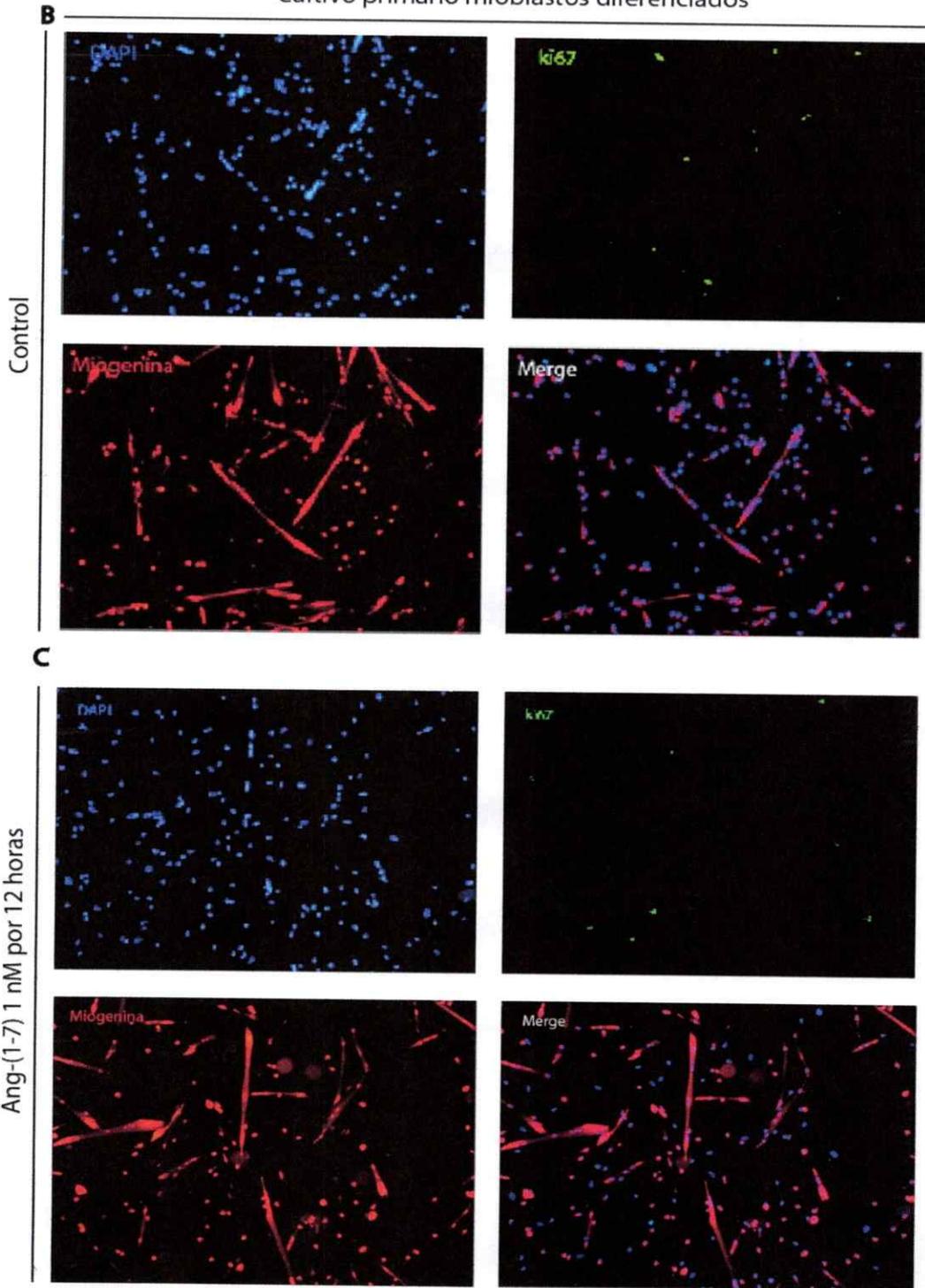
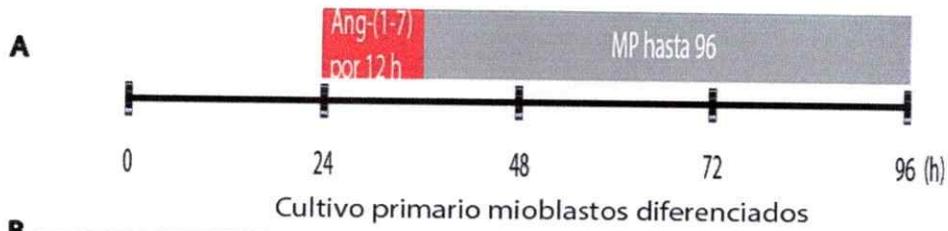
Figura 12. Ang-(1-7) promueve la retención de BrdU en núcleos asociados a mitotubos, estimulando la diferenciación.

A y B. Ensayo de pulso y caza con BrdU durante las primeras 24 horas del cultivo de mioblastos primarios. Además, en las 24 horas posteriores fueron tratados con Ang-(1-7). El cultivo fue fijado a las 72 horas. **C.** Luego de 24 horas adicionales en cultivo, el tratamiento con Ang-(1-7) 100 nM mostró un incremento en el porcentaje de núcleos asociados a mitotubos que retuvieron la marca de BrdU cuando estaban proliferando, lo que implica una transición más rápida hacia la diferenciación respecto al control (n=1).

4.3.4 Incremento en tiempo de incubación de Ang-(1-7) potencia la fusión de células satélite aisladas de músculo de ratón adulto

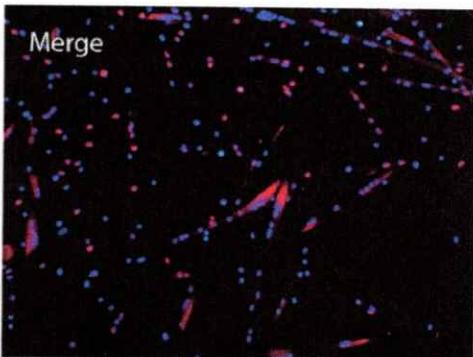
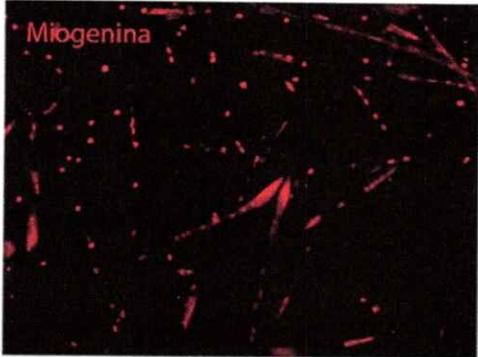
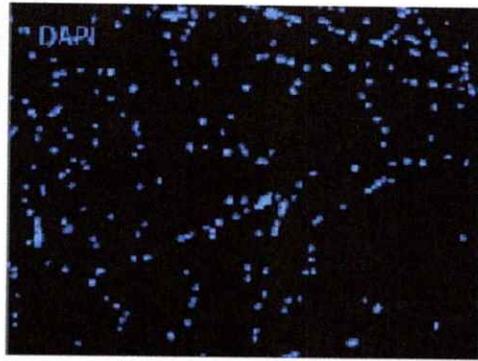
En el primer resultado de éste trabajo, se mostró un aumento en el nivel de fusión de mioblastos, dado un incremento en el número de núcleos asociados a miotubos presente en cada campo. Por otra parte, se mostró que la diferenciación de los mioblastos fue incrementada al ser tratados con Ang-(1-7) y formar nuevos miotubos según el experimento de dilución de BrdU. Siguiendo estos resultados, mioblastos primarios fueron cultivados en medio de proliferación por un día antes de adicionar concentraciones crecientes (1-100nM) de Ang-(1-7) por 12 horas. Según lo descrito en la **figura 13A** los cultivos fueron fijados 60 horas después, para determinar la expresión de ki67 y miogenina mediante IFI con tal de establecer otro parámetro que consolide las observaciones anteriores.

La **figura 13 (B, C, D, E)** muestra que 100 nM Ang-(1-7) induce un aumento significativo en el número y tamaño de los miotubos obtenidos en cultivo, aumentando aproximadamente tres veces respecto al control (nº de núcleos/miotubo; **figura 13G**). Lo anterior se correlaciona con una disminución en la proliferación celular (~50%) respecto de la condición control (**figura 13F**). Ninguno de los dos parámetros (proliferación y diferenciación) variaron en el rango 1-25 nM Ang-(1-7) respecto de los cultivos sin tratamiento. En conjunto, estos resultados son consistentes con el hecho de que Ang-(1-7) promueve la diferenciación de los mioblastos, lo que explica también la presencia de núcleos que retienen la marca de BrdU asociados a miotubos (**figura 12C**).



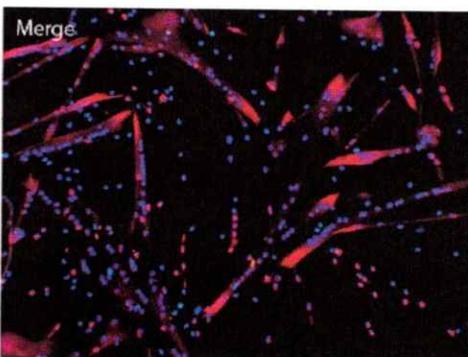
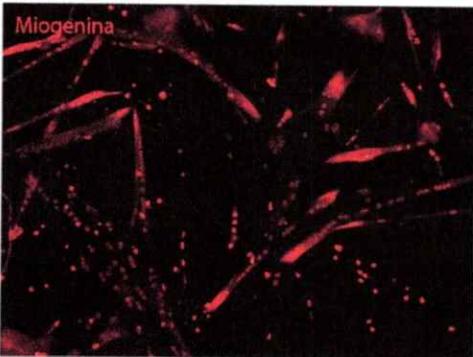
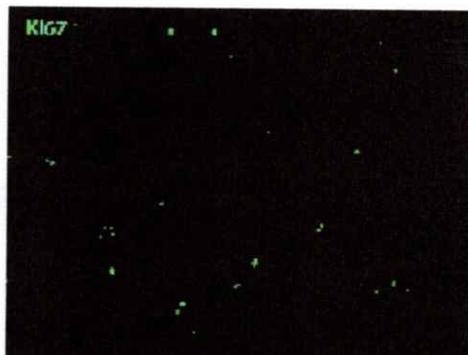
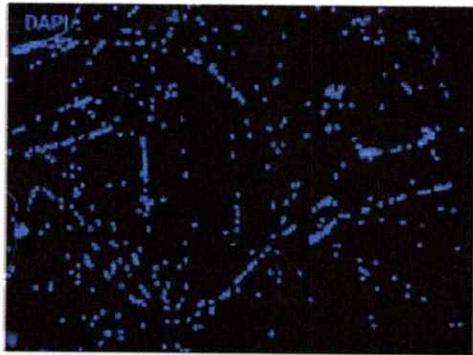
D

Ang-(1-7) 25 nM por 12 horas



E

Ang-(1-7) 100 nM por 12 horas



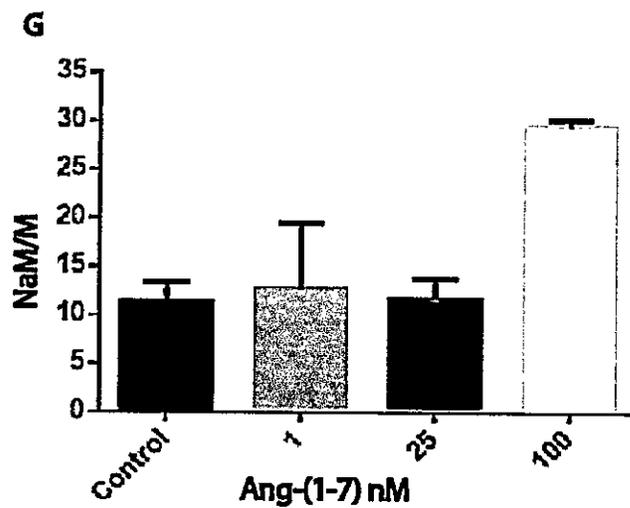
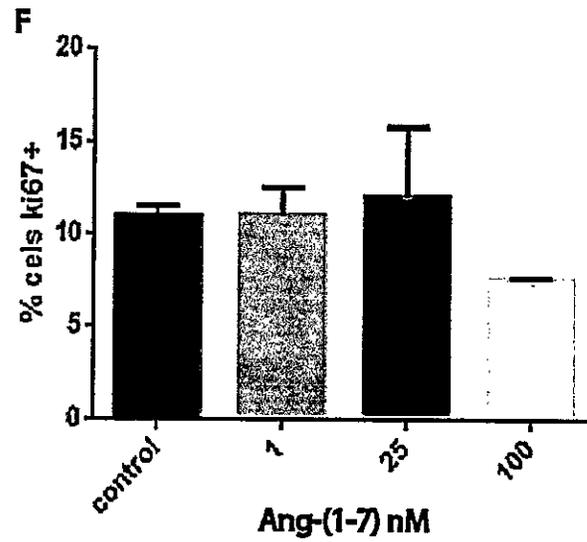


Figura 13. Exposición a Ang(1-7) potencia la capacidad miogénica de mioblastos.

A. MP tratados con Ang(1-7) por 12 h. A las 48 h, cambio a medio de diferenciación. Mantención de células hasta 96 h y luego fueron fijadas. **B, C, D.** En el rango 1-25 nM se mantuvo una diferenciación normal en cuanto a su índice de fusión, definido como NaM/M (núcleos asociados a miotubo por miotubo). Los MP fueron mantenidos durante 2 días en condición de proliferación y 2 días en diferenciación. **E.** De la misma forma, Ang(1-7) 100 nM tiene un efecto a largo plazo en la diferenciación miogénica. **F.** Además, en el experimento en que se tratan las células con Ang(1-7) 100 nM, se mostró que un porcentaje pequeño de células dejaron de proliferar y se diferenciaron. **G.** (n=2, experimento representativo)

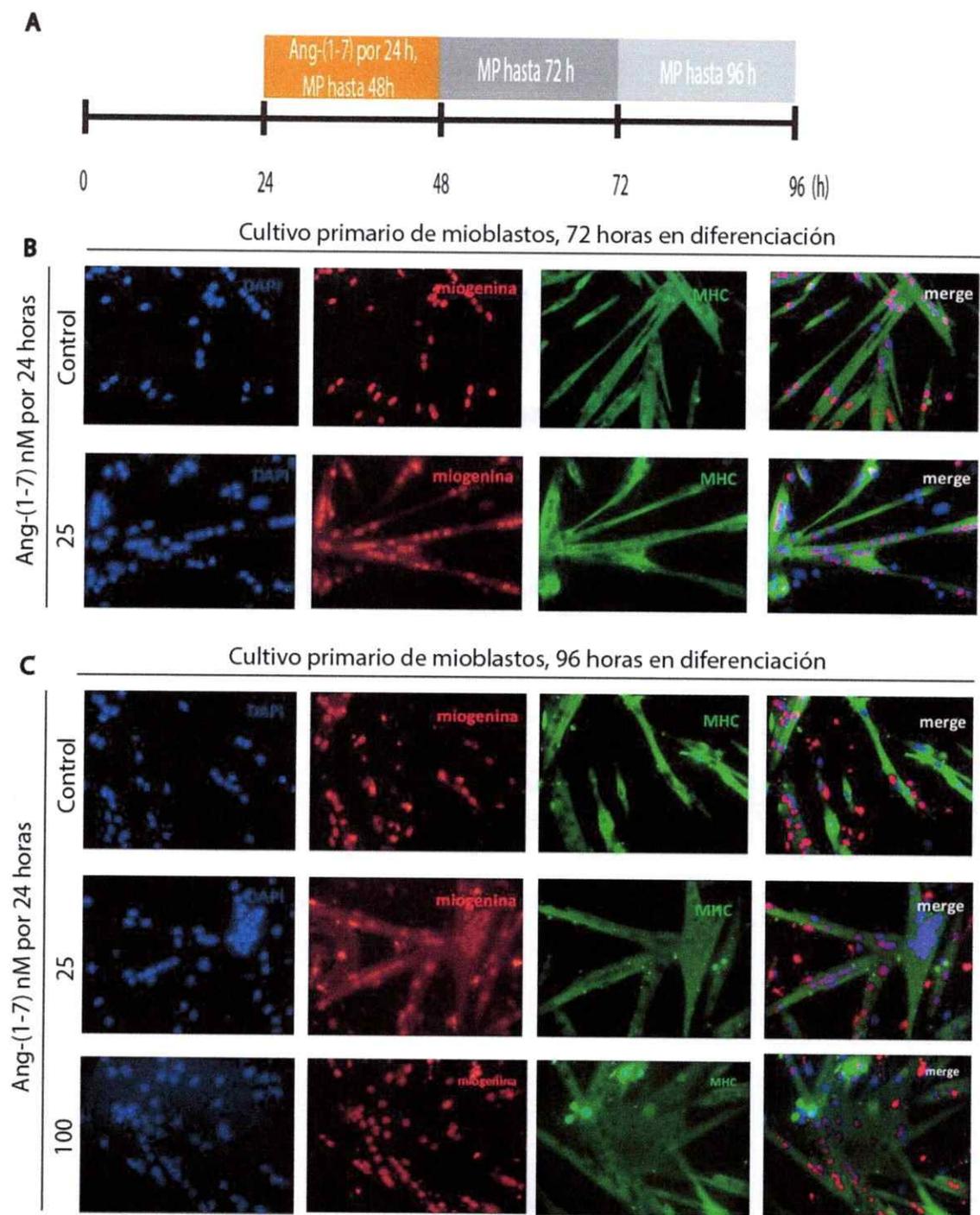
Para cuantificar la diferenciación e índice de fusión a las 48, 72 y 96 horas de cultivo, se realizó IFI para determinar la expresión de miogenina y e-MHC (**figura 14A**). En promedio, el índice de fusión a las 48 horas mostró poca variación, sin embargo, al analizar otras medidas de tendencia central como la mediana, se pudo mostrar de mejor forma el incremento de éste índice, condiciéndose con las imágenes obtenidas. La cuantificación mostrada en la **figura 14D** da cuenta de un incremento en el índice de fusión en el tratamiento con Ang-(1-7) respecto al control. Según la dispersión de los datos, se formaron muy pocos miotubos en la condición control, tendiendo la mediana del índice de fusión a cero, sin embargo, al tratar las células con Ang-(1-7) se forman más miotubos respecto del control y además, éstos tienen un mayor número de núcleos asociados.

El cultivo de 72 horas (**figura 14B, D**) mostró un incremento del índice de fusión de unas tres veces en el tratamiento con Ang-(1-7) 25 nM, relativo al control. También, en esta ventana de tiempo, prácticamente el 100% de las células expresaron miogenina, por lo que todas las células se han diferenciado.

Finalmente, en el cultivo de 96 horas (**figura 14C, D**) todas las células expresaron miogenina y se observaron miotubos de mayor superficie y con muchas ramificaciones. Al cuantificar con respecto a la mediana en ambos tratamientos, se cuadruplicó el índice de fusión.

En resumen, los resultados respecto al efecto del tiempo de incubación con Ang-(1-7) en la diferenciación de mioblastos primarios, mostraron que Ang-(1-7) potencia la diferenciación de estas células desde las 48 horas, incrementando su índice de fusión, alcanzando su máximo en estos experimentos a las 96 horas. Por otra parte, las incubaciones con 25 y 100 nM de Ang-(1-7) incrementaron la diferenciación en forma semejante, por lo que la dosis-dependencia del efecto se extiende hasta 100 nM respecto

a las dosis de incubación en cultivos primarios de mioblastos en condición de proliferación (hasta 25 nM de Ang-(1-7)).



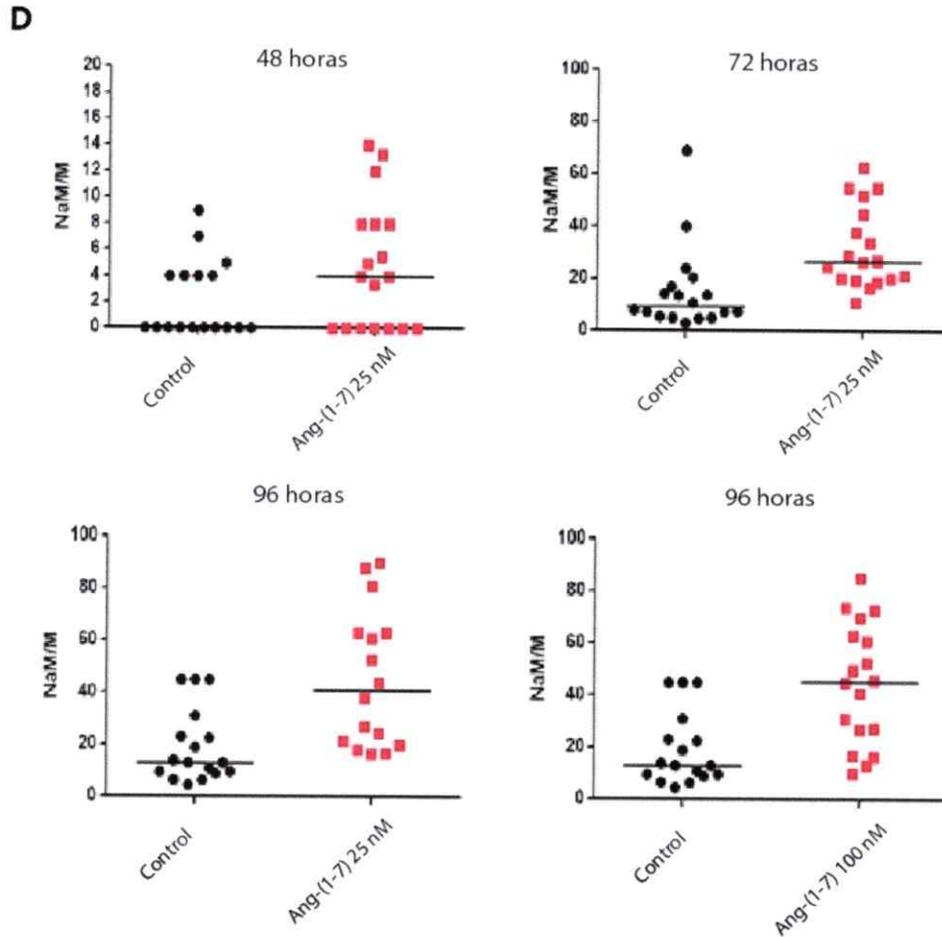


Figura 14. Ang-(1-7) estimula la fusión de mioblastos primarios.

A. Tratamiento de MP con Ang-(1-7) por 24 h y fueron fijadas a las 48, 72 y 96 horas (barra naranja, gris y amarilla respectivamente). **B.** Inmunofluorescencia cultivo primario de mioblastos de 72 horas totales. El porcentaje de células miogenina+ ya alcanzó casi un 100% (datos no mostrados) y se pudo observar una mayor fusión de mioblastos cuando las células fueron tratadas con 25 nM de Ang-(1-7). Incluso, disminuyó la cantidad de miotubos presentes por campo. **C.** Inmunofluorescencia de cultivo primario de mioblastos de 96 horas totales de diferenciación. En este caso, se probaron dos concentraciones de Ang-(1-7), resultando en ambos casos un incremento en la fusión en este punto. Además, se pudo apreciar aún más núcleos asociados a miotubos en el tratamiento con 100 nM de Ang-(1-7), puesto que esta concentración aumentó la eficiencia de fusión desde tiempos más tempranos (48 horas). **D.** La cuantificación de estos experimentos, muestra como la mediana de núcleos asociados a miotubos por miotubo (NaM/M) aumenta desde las 48 horas de cultivo, alcanzando el máximo a las 96 horas (n=2, experimento representativo).

5. DISCUSIÓN

Los efectos contrarios demostrados para Ang-II y Ang-(1-7) sumado a que ésta última ha sido descrita como protector de la atrofia muscular inducida por Ang-II (Cisternas et al., 2015) y que atenúa parámetros de atrofia provocada por desuso de un grupo muscular (Morales et al., 2016) junto a la posibilidad de que Ang-(1-7) tenga un efecto sobre la función de las CS (Cisternas et al., 2015; Marcus et al., 2013), dieron cabida a analizar el efecto de este péptido sobre CS activadas aisladas y CS adyacentes a miofibras aisladas de músculo.

En este trabajo se usaron dos aproximaciones *in vitro* para estudiar el efecto de Ang-(1-7) en CS; a) cultivos de CS disociadas del músculo y b) cultivo de miofibras aisladas donde las CS permanecen en su posición debajo de la lámina basal. En a, el protocolo para obtener el cultivo primario, libera las CS del músculo completo, ya que se requieren pasos de disrupción del tejido conectivo, reduciendo la contribución de células no miogénicas (Shefer and Yablonka-Reuveni, 2005). Esto permite estudiar parámetros que afectan la progenie de las CS como la proliferación, diferenciación y fusión de miotubos. En contraste, en b, se aíslan miofibras intactas que retienen las CS, o que permite estudiarlas en su nicho, donde se ha descrito que el programa miogénico es altamente coordinado en contraste con las CS aisladas lo que permite estudiar su activación (Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994).

5.1 Exposición de Ang-(1-7) activa a células satélite asociadas a fibras musculares de EDL

Las CS asociadas a las fibras musculares fueron mayormente activadas por el tratamiento con Ang-(1-7) por 48 horas (figura 4A/B). Esto quedó de manifiesto en el gráfico de la figura 4D, donde se muestra que la subpoblación de CS que co-expresan Pax7/MyoD,

aumentó al doble, lo que indica que esas células proliferaron en mayor medida, no obstante, éstas pueden dejar de expresar MyoD y volver al estado de reposo proliferativo con altos niveles de expresión de Pax7 (Bentzinger et al., 2013). Las células MyoD+/Pax7- también se incrementaron respecto al control y han adquirido un compromiso mayor con el linaje miogénico ya que han dejado de expresar Pax7 (Rudnicki and Jaenisch, 1995). Esto último, sugiere que debiesen estar expresando el factor de diferenciación miogenina (Olguin and Olwin, 2004), por lo que es necesario estudiar este marcador en la ventana de tiempo 24-72 horas. En este sentido, experimentos en que se desprendan las CS adheridas a las fibras y se cultiven, serían de utilidad para demostrar la importancia del nicho de las CS para la respuesta a Ang-(1-7) con respecto a la diferenciación, lo que permitiría complementar este trabajo.

5.2 Fibras musculares de EDL, responden diferencialmente a Ang-(1-7) en cuanto a su diámetro

Al cultivar fibras musculares de EDL durante 48 horas, éstas disminuyeron su diámetro naturalmente, probablemente debido a apoptosis, ya que hay evidencia de la degradación por segmentos sarcoplásmicos y que involucra proteólisis en miofibras (Tews, 2005). En comparación a un cultivo no tratado con Ang-(1-7) por 48 horas, se demostró una mantención del diámetro promedio. Es decir, las fibras tratadas con Ang-(1-7) luego de 48 horas, tuvieron un diámetro promedio como el de las fibras recién extraídas (0 horas). Respecto a esto, se ha descrito que Ang-(1-7) a través de Mas, previene eventos de apoptosis mionuclear, así como el incremento de marcadores apoptóticos como caspasa 3 activa y el ratio Bax/Bcl2 (Meneses et al., 2014), por lo que Ang-(1-7) favorece la mantención del nicho de las CS.

Al graficar la dispersión de los datos y comparando los cultivos respecto de la mediana de los diámetros, se pudo dar cuenta de la formación de dos poblaciones de fibras

(figura 5B), mostrando de mejor forma la diferencia en las microfotografías; esto sugiere que solo algunas miofibras responden a Ang-(1-7).

También hay que mencionar que un tratamiento *in vivo* con Ang-II disminuye el diámetro de las fibras de algunos músculos inferiores (Morales et al., 2015) respecto al control ya que el músculo esquelético también expresa el receptor AT1 de Ang-II (Cabello-Verrugio et al., 2012), por lo que es coherente que Ang-(1-7) pueda proteger la degradación de la fibra ya que el receptor Mas se expresa en el músculo esquelético (Prasannarong et al., 2012; Morales et al., 2015) y se ha descrito expresión del gen mas en mioblastos y miotubos C2C12 (Cofre et al., 2015). De acuerdo a esto último, sumado a los anteriores resultados en mioblastos aislados, es coherente que Ang-(1-7) tenga un efecto directo sobre las CS y se pueda apreciar claramente en el modelo de CS asociado a fibras, sobre todo respecto a la activación, ya que las células no están activadas inicialmente (Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994).

5.3 Ang-(1-7) potencia la capacidad miogénica de CS activadas aisladas de ratón adulto

En el experimento de este trabajo mostrado en la figura 6, la cantidad de células iniciales fue menor a cualquier otro realizado posteriormente, lo que llevó a tener una baja confluencia del cultivo, por lo que los miotubos formados fueron más delgados en comparación a otros cultivos de experimentos posteriores. No obstante, se observó el efecto de aumentar el número de mioblastos y su índice de fusión que se mantuvo en experimentos posteriores en que se sembraron confluencias mayores

Con el objetivo de establecer si el incremento en la fusión ocurrió debido al tratamiento con Ang-(1-7) que produjo un incremento en la proliferación se incubaron mioblastos extraídos de ratón adulto a diferentes tiempos con el Ang-(1-7) y fueron

marcados con ki67. Con ello, se pudo determinar que un tratamiento corto con Ang-(1-7) (6 horas) incrementó hasta en un 50% las células que se encontraban proliferando (**figura 7**), mientras que, en tiempos de incubación superiores, los mioblastos ki67+ se incrementaron en un 10% respecto al control cuando fueron tratados por 12 horas con Ang-(1-7) (**figura 9**). Respecto al incremento de la proliferación, se cuenta con el antecedente que Ang-(1-7) estimula la proliferación de progenitores endoteliales que son células tipo células madres, que poseen el marcador CD34 (Heringer-Walther et al., 2009), como las CS. Inclusive, se ha descrito que responden a este estímulo través del receptor Mas (Jarajapu et al., 2013) y por otra parte, también se ha mostrado una disminución en parámetros atróficos previo tratamiento con Ang-(1-7), vía Mas en ratones atróficos (Morales et al., 2016).

De todas formas, se hace necesario sustentar este resultado con otros marcadores, como fosfo-histona-3 que marca células en mitosis (Aune et al., 2011), citometría de flujo, que permite estudiar las distintas fases de ciclo celular y/o con marcadores que las células puedan metabolizar mientras estén vivas tales como MTT en que una célula metabólicamente activa, reduce el compuesto químico, en parte por la acción de enzimas deshidrogenasas, (Mosmann, 1983) en tiempos menores e iguales a 48 horas ya que es en esta ventana de tiempo que las CS están proliferando y se vieron estimuladas por Ang-(1-7).

La incubación por 24 horas con Ang-(1-7), (**figura 10**) indica que el incremento en la proliferación se detiene. Por lo tanto, el hecho de aumentar el tiempo de incubación eliminó el efecto dosis-dependiente en lo que respecta a porcentaje de células marcadas con ki67. Sin embargo, hay que mencionar que el marcador ki67 no permite distinguir alguna fase del ciclo celular en particular, sino solo establecer el porcentaje de células del total que están proliferando en determinado momento (Ladstein et al., 2010; Aune et al., 2011).

Las dosis y tiempos de incubación de Ang-(1-7) testeadas mostraron una estimulación temprana y transiente de la proliferación, lo cual explica porque el incremento de la proliferación va disminuyendo en el tiempo y además permite plantear la idea de que si hay un mayor número de células luego del tratamiento con Ang-(1-7), éstas pueden fusionarse con el correr del tiempo, lo que explicaría el incremento del número de núcleos asociados a miotubos (figura 4C) y/o de núcleos asociados a miotubos por miotubo (figura 12 y figura 14). Sumado a esto, el resultado de un incremento en el porcentaje de células marcadas con BrdU que están fusionadas, refuerza la idea de que Ang-(1-7) promovió que las células dejaron de dividirse y por ende se diferenciaron, más que afectar directamente la proliferación (figura 12) y por tanto, la diferenciación puede ocurrir tempranamente, lo cual se ve reflejado en la figura 11 en que se observó la temporalidad de un cultivo de mioblastos primarios desde las 48 horas, mostrándose un mayor número de miotubos formados en el tratamiento con Ang-(1-7) respecto a la situación control, siendo además cualitativamente más grandes.

Por otra parte, podría argumentarse que Ang-(1-7) estimula la migración de mioblastos (Mohan K Raizada, 2014) y que por ello se incrementa la eficiencia en el proceso de fusión. En este sentido, en un experimento de la herida en células C2C12 (datos no mostrados), se observó que Ang-(1-7) pudo cerrar más rápido en el tiempo un corte de 1000 μm de ancho (entre 12-20 horas) respecto al control (entre 24-48 horas). De todas maneras, hay que mencionar que existen antecedentes en que mioblastos primarios tratados con Ang-II en trans-pocillos, reduce la migración de mioblastos primarios (Johnston et al., 2010) y que Ang-(1-7), vía Mas, estimula la migración de progenitores endoteliales CD34+ como las CS (Jarajapu et al., 2013). Entonces, sería interesante realizar un experimento usando mioblastos primarios sembrados en estos trans-pocillos, que permitan observar la migración de mioblastos en tiempos cortos tratados con Ang-(1-7) como en el ensayo descrito.

Finalmente, para poder distinguir si Ang-(1-7) está estimulando la diferenciación de forma más directa, sería de utilidad evaluar la expresión de miogenina en intervalos de tiempo cercanos a las 24-48 horas, dado que, desde antes de las 72 horas, prácticamente todas las células expresan este marcador (figura 14) y además cuantificar el nivel de activación del promotor de miogenina.

5.4 Diferencias rango de dosis-activo de Ang-(1-7) en mioblastos primarios respecto de la línea celular de mioblastos C2C12

El rango de dosis de Ang-(1-7) en que se ve aumentada la proliferación fue más limitada en C2C12 (figura 8) en comparación al de mioblastos primarios (figura 6 y figura 7 y figura 9). Esto pudo deberse a lo que se ha descrito en las células C2C12, respecto a que alcanzan una confluencia mayor más rápido respecto a los mioblastos primarios (Tanaka et al., 2011).

5.5 Perspectivas futuras de Ang-(1-7)

Si bien se ha estudiado la expresión de Mas en la línea celular de mioblastos C2C12 y en atrofia por inmovilización que el efecto de Ang-(1-7) se debe específicamente a este receptor, mejorando la regeneración y parámetros atróficos (Cisternas et al., 2015; Morales et al., 2015) hasta ahora no se había estudiado el efecto directo de Ang-(1-7) sobre CS. El conocimiento adquirido respecto a Ang-(1-7) en músculo ha llevado a la creación de una patente asociada a agonistas del receptor Mas (Dos Santos et al. 2014) que incluso avala la administración oral de Ang-(1-7) en ratones, mejorando sus efectos en la regeneración, respecto a la inyección por bomba osmótica en un grupo muscular (Acuña et al., 2014). Sumado a esto, los resultados de este trabajo, apuntan a que Ang-(1-7) estimula directamente a las CS en cuanto a su capacidad miogénica, así también como favorece la regeneración del músculo *in vivo* con atrofia muscular inducida (Morales et al., 2016). En

torno a este punto, se hace necesario determinar los mecanismos moleculares por los cuales Ang-(1-7) ejerce su efecto en las CS para tener un conocimiento más acabado sobre cómo funciona Ang-(1-7) y que pueda ser considerado como un tratamiento validado en casos de atrofia muscular en un futuro cercano.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- a) Tratamiento de miofibras de EDL con Ang-(1-7) durante 48 horas, incrementa al doble las subpoblaciones de CS Pax7+/MyoD+ y Pax7-/MyoD+, por lo que potencia su activación.
- b) Tratamiento de miofibras de EDL con Ang--(1-7) inhibe la disminución del diámetro en una subpoblación de miofibras.
- c) Ang-(1-7) estimula levemente la proliferación de mioblastos primarios.
- d) Exposición temprana de mioblastos primarios a Ang--(1-7) incrementa tres veces la fusión de mionúcleos por lo que potencia la diferenciación de estos.



7. BIBLIOGRAFÍA

Abmayr, S.M. and Pavlath, G.K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **139**: 641–56.

Acuña, M.J., Pessina, P., Olguin, H., Cabrera, D., Vio, C.P., Bader, M., Muñoz-Canoves, P., Santos, R. a, Cabello-Verrugio, C., and Brandan, E. (2014). Restoration of muscle strength in dystrophic muscle by angiotensin-1-7 through inhibition of TGF- β signalling. *Hum. Mol. Genet.* **23**: 1237–49.

Allbrook, D.B., Han, M.F., and Hellmuth, A.E. (1971). Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. *Pathology* **3**: 223–43.

Allen, D.L., Linderman, J.K., Roy, R.R., Bigbee, A.J., Grindeland, R.E., Mukku, V., and Edgerton, V.R. (1997). Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol Cell Physiol* **273**: C579–587.

Aune, G., Stunes, A.K., Tingulstad, S., Salvesen, O., Syversen, U., and Torp, S.H. (2011). The proliferation markers Ki-67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **4**: 444–53.

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Dumont, N. a, and Rudnicki, M. a (2013). Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* **14**: 1062–72.

Biressi, S. and Asakura, A. (2012). Satellite Cells and the Universe of Adult Muscle Stem Cells. *J. Stem Cell Res. Ther. Suppl* **11**: 493–496.

Bodine, S.C. et al. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**: 1704–8.

Bonaldo, P. and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* **6**: 25–39.

Brack, A.S., Bildsoe, H., and Hughes, S.M. (2005). Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J. Cell Sci.* **118**: 4813–21.

Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., and Rando, T.A. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* **317**: 807–810.

Brink, M., Price, S.R., Chrast, J., Bailey, J.L., Anwar, A., Mitch, W.E., and Delafontaine, P. (2001). Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates autocrine insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **142**: 1489–96.

Brink, M., Wellen, J., and Delafontaine, P. (1996). Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J. Clin. Invest.* **97**: 2509–16.

Cabello-Verrugio, C., Acuña, M.J., Morales, M.G., Becerra, A., Simon, F., and Brandan, E. (2011). Fibrotic response induced by angiotensin-II requires NAD(P)H oxidase-induced reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**: 665–70.

Cabello-Verrugio, C., Córdova, G., and Salas, J.D. (2012). Angiotensin II: role in skeletal muscle atrophy. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**: 560–9.

Chakravarthy, M. V, Davis, B.S., and Booth, F.W. (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **89**: 1365–79.

Chappell, M.C., Marshall, A.C., Alzayadneh, E.M., Shaltout, H. a, and Diz, D.I. (2014). Update on the Angiotensin converting enzyme 2-Angiotensin (1-7)-MAS receptor axis: fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**: 201.

Cisternas, F., Morales, M.G., Meneses, C., Simon, F., Brandan, E., Abrigo, J., Vazquez, Y., and Cabello-Verrugio, C. (2015). Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-dependent mechanism. *Clin. Sci.* **128**: 307-319.

Cofre, C., Acuña, M.J., Contreras, O., Morales, M.G., Riquelme, C., Cabello-Verrugio, C., and Brandan, E. (2015). Transforming growth factor type- β inhibits Mas receptor expression in fibroblasts but not in myoblasts or differentiated myotubes; Relevance to fibrosis associated to muscular dystrophies. *BioFactors* **41**: 111-120.

Cornelison, D.D. and Wold, B.J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **191**: 270-283.

Corrêa, T.D., Takala, J., and Jakob, S.M. (2015). Angiotensin II in septic shock. *Crit. Care* **19**: 98.

Dehoux, M.J.M., van Beneden, R.P., Fernández-Celemín, L., Lause, P.L., and Thissen, J.-P.M. (2003). Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection. *FEBS Lett.* **544**: 214-7.

Doerschug, K.C., Delsing, A.S., Schmidt, G.A., and Ashare, A. (2010). Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis. *Crit. Care* **14**: R24.

Droguett, R., Cabello-Verrugio, C., Santander, C., and Brandan, E. (2010). TGF-beta receptors, in a Smad-independent manner, are required for terminal skeletal muscle differentiation. *Exp. Cell Res.* **316**: 2487–503.

Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J.L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S.R., and Mitch, W.E. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J. Clin. Invest.* **113**: 115–23.

Fyhrquist, F. and Saijonmaa, O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *J. Intern. Med.* **264**: 224–36.

Guo, B.-S., Cheung, K.-K., Yeung, S.S., Zhang, B.-T., and Yeung, E.W. (2012). Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. *PLoS One* **7**: e30348.

Gwathmey, T.M., Pendergrass, K.D., Reid, S.D., Rose, J.C., Diz, D.I., and Chappell, M.C. (2010). Angiotensin-(1-7)-angiotensin-converting enzyme 2 attenuates reactive oxygen species formation to angiotensin II within the cell nucleus. *Hypertension* **55**: 166–71.

Hauerslev, S., Vissing, J., and Krag, T.O. (2014). Muscle atrophy reversed by growth factor activation of satellite cells in a mouse muscle atrophy model. *PLoS One* **9**: e100594.

He, W.A. et al. (2013). NF- κ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. *J. Clin. Invest.* **123**: 4821–4835.

Heringer-Walther, S., Eckert, K., Schumacher, S.-M., Uharek, L., Wulf-Goldenberg, A., Gembardt, F., Fichtner, I., Schultheiss, H.-P., Rodgers, K., and Walther, T. (2009). Angiotensin-(1-7) stimulates hematopoietic progenitor cells in vitro and in vivo. *Haematologica* **94**: 857–60.

- Jarajapu, Y.P.R., Bhatwadekar, A.D., Caballero, S., Hazra, S., Shenoy, V., Medina, R., Kent, D., Stitt, A.W., Thut, C., Finney, E.M., Raizada, M.K., and Grant, M.B. (2013).** Activation of the ACE2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis enhances the reparative function of dysfunctional diabetic endothelial progenitors. *Diabetes* **62**: 1258–69.
- Johnston, A.P.W., Baker, J., Bellamy, L.M., McKay, B.R., De Lisio, M., and Parise, G. (2010).** Regulation of muscle satellite cell activation and chemotaxis by angiotensin II. *PLoS One* **5**: e15212.
- Kalupahana, N.S. and Moustaid-Moussa, N. (2012).** The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obes. Rev.* **13**: 136–49.
- Kang Jong-Sun, K.R.S. (2011).** Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Care* **13**: 1243–248.
- Keefe, A.C., Lawson, J. a., Flygare, S.D., Fox, Z.D., Colasanto, M.P., Mathew, S.J., Yandell, M., and Kardon, G. (2015).** Muscle stem cells contribute to myofibres in sedentary adult mice. *Nat. Commun.* **6**: 7087.
- Klingler, W., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., and Schleip, R. (2012).** The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* **31**: 184–95.
- Kuang, S., Gillespie, M. a, and Rudnicki, M. a (2008).** Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **2**: 22–31.
- Ladstein, R.G., Bachmann, I.M., Straume, O., and Akslen, L.A. (2010).** Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer* **10**: 140.
- Lee, K.H., Baek, M.Y., Moon, K.Y., Song, W.K., and Ha, D.B. (1994).** Nitric Oxide as a Messenger Molecule for Myoblast Fusion ". *J. Biol. Chem.* **269**: 14371–14374.

Lund, D.D., Brooks, R.M., Faraci, F.M., and Heistad, D.D. (2007). Role of angiotensin II in endothelial dysfunction induced by lipopolysaccharide in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**: H3726–31.

von Maltzahn, J., Jones, A.E., Parks, R.J., and Rudnicki, M.A. (2013). Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 16474–9.

Marcus, Y. et al. (2013). Angiotensin 1-7 as means to prevent the metabolic syndrome: lessons from the fructose-fed rat model. *Diabetes* **62**: 1121–30.

Mendias, C.L., Gumucio, J.P., Davis, M.E., Bromley, C.W., Davis, C.S., and Brooks, S. V (2012). Transforming growth factor-beta induces skeletal muscle atrophy and fibrosis through the induction of atrogin-1 and scleraxis. *Muscle Nerve* **45**: 55–9.

Meneses, C., Morales, M.G., Abrigo, J., Simon, F., Brandan, E., and Cabello-Verrugio, C. (2014). The angiotensin-(1-7)/Mas axis reduces myonuclear apoptosis during recovery from angiotensin II-induced skeletal muscle atrophy in mice. *Pflugers Arch.*: 1–10.

Mitchell, P.O. and Paviath, G.K. (2004). Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**: C1753–62.

Mohan K Raizada, Y.P.J.N.S.L.G.N.A.S.B.B. (2014). Abstract 557: ACE2/Angiotensin-(1-7) Stimulates Vasoprotection-Relevant Functions of Human CD34+ Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**.

Morales, M.G., Abrigo, J., Acuña, M.J., Santos, R.A., Bader, M., Brandan, E., Simon, F., Olguin, H., Cabrera, D., and Cabello-Verrugio, C. (2016). Angiotensin-(1-7) attenuates disuse skeletal muscle atrophy in mice via its receptor, Mas. *Dis. Model. Mech.* **9**: 441–9.

Morales, M.G., Abrigo, J., Meneses, C., Cisternas, F., Simon, F., and Cabello-Verrugio, C. (2015). Expression of the Mas receptor is upregulated in skeletal muscle wasting. *Histochem. Cell Biol.* **143**: 131–41.

Morales, M.G., Abrigo, J., Meneses, C., Simon, F., Cisternas, F., Rivera, J.C., Vazquez, Y., and Cabello-Verrugio, C. (2014). The Ang-(1-7)/Mas-1 axis attenuates the expression and signalling of TGF- β 1 induced by AngII in mouse skeletal muscle. *Clin. Sci. (Lond).* **127**: 251–64.

Morales, M.G., Vazquez, Y., Acuña, M.J., Rivera, J.C., Simon, F., Salas, J.D., Alvarez Ruf, J., Brandan, E., and Cabello-Verrugio, C. (2012). Angiotensin II-induced pro-fibrotic effects require p38MAPK activity and transforming growth factor beta 1 expression in skeletal muscle cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**: 1993–2002.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55–63.

Mourikis, P. and Relaix, F. (2016). Activated Muscle Satellite Cells Chase Ghosts. *Cell Stem Cell* **18**: 160–162.

Muñoz, M.C., Giani, J.F., and Dominici, F.P. (2010). Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas. *Regul. Pept.* **161**: 1–7.

Olguin, H. and Olwin, B. (2012). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self- renewal. *Dev. Biol.* **275**: 375–388.

Olguin, H. and Olwin, B. (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev. Biol.* **275**: 375–388.

Olguin, H.C., Yang, Z., Tapscott, S.J., and Olwin, B.B. (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J. Cell Biol.* **177**: 769–79.

Pallafacchina, G., François, S., Regnault, B., Czarny, B., Dive, V., Cumano, A., Montarras, D., and Buckingham, M. (2010). An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res.* **4**: 77–91.

Passos-Silva, D.G., Verano-Braga, T., and Santos, R. a S. (2013). Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin. Sci. (Lond).* **124**: 443–56.

Pasut, A., Jones, A.E., and Rudnicki, M.A. (2013). Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. *J. Vis. Exp.*: e50074.

Paulsen, G., Cramer, R., Benestad, H.B., Fjeld, J.G., Mørkrid, L., Hallén, J., and Raastad, T. (2010). Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **42**: 75–85.

Pendergrass, K.D., Gwathmey, T.M., Michalek, R.D., Grayson, J.M., and Chappell, M.C. (2009). The angiotensin II-AT1 receptor stimulates reactive oxygen species within the cell nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**: 149–54.

Pomiès, P., Rodriguez, J., Blaquièrre, M., Sedraoui, S., Gouzi, F., Carnac, G., Laoudj-Chenivresse, D., Mercier, J., Préfaut, C., and Hayot, M. (2015). Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J. Cell. Mol. Med.* **19**: 175–86.

Prasannarong, M., Santos, F.R., and Henriksen, E.J. (2012). ANG-(1–7) reduces ANG II-induced insulin resistance by enhancing Akt phosphorylation via a Mas receptor-dependent mechanism in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **426**: 369–373.

- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R.** (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 3116–3120.
- Rezk, B.M., Yoshida, T., Semprun-Prieto, L., Higashi, Y., Sukhanov, S., and Delafontaine, P.** (2012). Angiotensin II infusion induces marked diaphragmatic skeletal muscle atrophy. *PLoS One* **7**: e30276.
- Rigamonti, E., Touvier, T., Clementi, E., Manfredi, A. a, Brunelli, S., and Rovere-Querini, P.** (2013). Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. *J. Immunol.* **190**: 1767–77.
- Rodgers, K.E., Oliver, J., and diZerega, G.S.** (2006). Phase I/II dose escalation study of angiotensin 1-7 [A(1-7)] administered before and after chemotherapy in patients with newly diagnosed breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **57**: 559–68.
- Rudnicki, M.A. and Jaenisch, R.** (1995). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays* **17**: 203–9.
- Russell, S.T., Sanders, P.M., and Tisdale, M.J.** (2006). Angiotensin II directly inhibits protein synthesis in murine myotubes. *Cancer Lett.* **231**: 290–4.
- Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S., and Blau, H.M.** (2008). Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* **456**: 502–6.
- Sanders, P.M., Russell, S.T., and Tisdale, M.J.** (2005). Angiotensin II directly induces muscle protein catabolism through the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway and may play a role in cancer cachexia. *Br. J. Cancer* **93**: 425–34.

Dos Santos Robson Augusto Souza, Enrique Brandan, Maria José Acuna, Claudio Cabello-Verrugio, Anderson José Ferreira, Oliveira Sampaio Walkyria Neyde De, Lulu Ivana Silva, Maria José Campagnole-Santos, Reis Adelina Martha Dos, Castro Leal Marcelo De, F.F.E.S.R.D.- (2014). Pharmaceutical compositions containing a mas receptor agonist for treating degenerative muscular diseases.

Scharner, J. and Zammit, P.S. (2011). The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet. Muscle* 1: 28.

Schultz, E., Gibson, M.C., and Champion, T. (1978). Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J. Exp. Zool.* 206: 451–6.

Seale, P. (2000). Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* 102: 777–786.

Shefer, G. and Yablonka-Reuveni, Z. (2005). Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells. *Methods Mol. Biol.* 290: 281–304.

Sidique, I.L. (2013). Evaluation of skeletal muscle satellite cell activity in rodent models depicting muscle hypertrophy and atrophy. PhD Thesis. University of Nottingham. Available at:http://eprints.nottingham.ac.uk/13899/1/Idris_Sidique_Thesis_Final_Hardbound_Copy_May_2013.pdf

Tanaka, K., Sato, K., Yoshida, T., Fukuda, T., Hanamura, K., Kojima, N., Shirao, T., Yanagawa, T., and Watanabe, H. (2011). Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication. *Muscle Nerve* 44: 968–77.

Tews, D.S. (2005). Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 32: 443–458.

- Tuca Rodríguez, A., Calsina-Berna, A., González-Barboteo, J., and Gómez-Batiste Alentorn, X. (2010).** Caquexia en cáncer. *Med. Clin. (Barc)*. **135**: 568–572.
- Venable, J.H. (1966).** Morphology of the cells of normal, testosterone-deprived and testosterone-stimulated levator ani muscles. *Am. J. Anat.* **119**: 271–301.
- Verdijk, L.B., Dirks, M.L., Snijders, T., Prompers, J.J., Beelen, M., Jonkers, R.A.M., Thijssen, D.H.J., Hopman, M.T.E., and Van Loon, L.J.C. (2012).** Reduced satellite cell numbers with spinal cord injury and aging in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* **44**: 2322–30.
- Viguie, C.A., Lu, D.X., Huang, S.K., Rengen, H., and Carlson, B.M. (1997).** Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Anat. Rec.* **248**: 346–54.
- Wang, Y.X. and Rudnicki, M. a (2012).** Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**: 127–33.
- Wernig, A., Irintchev, A., and Weisshaupt, P. (1990).** Muscle injury, cross-sectional area and fibre type distribution in mouse soleus after intermittent wheel-running. *J. Physiol.* **428**: 639–52.
- Wray, C.J., Mammen, J.M. V, Hershko, D.D., and Hasselgren, P.-O. (2003).** Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 698–705.
- Yablonka-Reuveni, Z. and Rivera, A.J. (1994).** Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev. Biol.* **164**: 588–603.
- Yaffe, D. and Saxel, O. (1977).** Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**: 725–727.

- Yamada, K., Iyer, S.N., Chappell, M.C., Ganten, D., and Ferrario, C.M. (1998).** Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension* **32**: 496–502.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M. a (2013).** Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* **93**: 23–67.
- Yoshida, T., Galvez, S., Tiwari, S., Rezk, B.M., Semprun-Prieto, L., Higashi, Y., Sukhanov, S., Yablonka-Reuveni, Z., and Delafontaine, P. (2013).** Angiotensin II inhibits satellite cell proliferation and prevents skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **288**: 23823–32.
- Yoshida, T., Huq, T.S., and Delafontaine, P. (2014).** Angiotensin type 2 receptor signaling in satellite cells potentiates skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **289**: 26239–48.
- Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. a, and Beauchamp, J.R. (2004).** Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* **166**: 347–57.
- Zhang, K., Sha, J., and Harter, M.L. (2010a).** Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. *J. Cell Biol.* **188**: 39–48.
- Zhang, L., Du, J., Hu, Z., Han, G., Delafontaine, P., Garcia, G., and Mitch, W.E. (2009).** IL-6 and serum amyloid A synergy mediates angiotensin II-induced muscle wasting. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**: 604–12.
- Zhang, L., Wang, X.H., Wang, H., Du, J., and Mitch, W.E. (2010b).** Satellite cell dysfunction and impaired IGF-1 signaling cause CKD-induced muscle atrophy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**: 419–27.