



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“Estudio del patrón de expresión proteica mediada por  
señales de calcio en células musculares C2C12  
estimuladas eléctricamente”.**

**Mariana Rocío Lorenzo Alvez**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

**PROFESOR GUIA: DRA. ANDREA V. MAHN OSSES**

**Proyecto FONDECYT n° 1061154**  
Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula

**SANTIAGO – CHILE  
2009**



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## “Estudio del patrón de expresión proteica mediada por señales de calcio en células musculares C2C12 estimuladas eléctricamente”.

**Mariana Rocío Lorenzo Alvez**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: Dra. Andrea Mahn	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: Dr. José Luis Arias	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: Dr. Eduardo Kessi	.....	.....

**SANTIAGO – CHILE  
2010**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis Maestros por entregarme su atención, su apoyo y sus conocimientos imprescindibles para la formación de criterio, crecer como persona y desenvolverme responsablemente como profesional.

A Quienes me han enseñado la cortesía, a cultivar un espíritu indómito y hacer con amor toda actividad que se realice.

A Quienes me entregaron su cariño y acobijaron en un abrazo o una palabra en momentos de desaliento.

Dedicado a mis padres Rosario Alvez y Ramón Lorenzo.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>1- INTRODUCCION</b>	3
<b>2- REVISION BIBLIOGRÁFICA</b>	
2.1 - Señales de calcio en músculo esquelético.	4
2.2 - Señales de calcio asociadas al núcleo celular.	5
2.3 - Cascadas transduccionales dependientes de calcio.	6
2.4 - Expresión genética asociada a la señal lenta de calcio.	8
<b>3- HIPÓTESIS</b>	9
<b>4- OBJETIVOS</b>	9
4.1- Objetivo general	9
4.2- Objetivos específicos	9
<b>5- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
5.1- Cultivo celular.	10
5.2- Diseño experimental.	10
5.3 - Estimulación eléctrica.	10
5.4 - Obtención del extracto de proteína total.	10
5.5 - Cuantificación de Proteína.	10
5.6 - Electroforesis bidimensional.	11
5.7 - Tinción de geles con Azul de Coomassie y Tinción con Nitrato de Plata (AgNO <sub>4</sub> ).	12
5.8 - Digitalización de imágenes de geles 2D-PAGE	12
5.9 - Análisis Estadístico.	12
5.10- Identificación de la proteína de interés por medio de Programa Flicker para análisis de geles 2-D y Espectrometría de Masa (MS)	12

## **6- RESULTADOS**

<b>6.1-</b> Caracterización del patrón de expresión proteica del cultivo celular línea C2C12.	14
<b>6.2 -</b> Comparación de los patrones proteicos control y estimulado. Geles 2D-PAGE control y estimulado. Tinción Azul de Coomassie.	15
Geles 2D-PAGE control y estimulado. Tinción Nitrato de Plata.	16
<b>6.3 -</b> Análisis de las imágenes.	
Marcación (nº) de manchas proteicas (1- 31) para análisis.	17
Comparación entre geles control y estimulado por medio del programa Flicker para geles 2D-PAGE.	18
Análisis estadístico para cada mancha proteica y determinación de diferencias estadísticamente significativas (control y estimulado).	19
<b>6.4 -</b> Identificación de proteína de expresión diferencial	20

## **7- DISCUSIÓN**

<b>7.1 -</b> Proteínas de estrés calórico.	20
<b>7.2 -</b> Estructura y función de la HSP70.	21
<b>7.3 -</b> Rol de las Hsp70 en células músculoesqueléticas.	22
<b>7.4 -</b> Enfermedades relacionadas con HSP70.	23
<b>7.5 -</b> Terapias y tratamientos en enfermedades neuromusculares.	25

## **8- CONCLUSIONES**

## **9- BIBLIOGRAFÍA**

## RESUMEN

El cultivo de células C2C12 de músculo esquelético responde a la depolarización de membrana producida por estimulación eléctrica, generando una señal lenta de calcio. Esto se traduce en un aumento de la concentración de calcio en el núcleo mediada por el receptor de Inositol 1, 4, 5 - trifosfato (IP3R), activando factores transcripcionales y regulando la expresión de ciertos genes tempranos.

Esta Memoria de Título relaciona la síntesis proteica en cultivo celular C2C12 con la generación de la señal lenta de calcio intracelular inducida por estimulación eléctrica.

En el desarrollo de esta investigación se utilizaron cultivo celular C2C12 diferenciados a miotubos, estimulación eléctrica directa y electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). El análisis de los geles se realizó mediante el programa Flicker; y el análisis estadístico (t de Student con un 95% de confianza) mediante el programa StatGraphics Plus 5.1<sup>TM</sup>.

La identificación de las manchas de proteína se realizó mediante espectrometría de masas (MS) y búsqueda en bases de datos específicas (MASCOT, SwissProt, MS – Fit y ProFound).

Los resultados obtenidos permitieron detectar cambios significativos en la expresión proteica de células musculares C2C12 sometidas a estimulación eléctrica.

La proteína expresada diferencialmente fue la Hsp70 o proteína de estrés calórico de 70KDa, la que aumentó su expresión en respuesta al estrés producido por la estimulación eléctrica. Esta proteína cumple un importante rol en el metabolismo proteico, facilita la regeneración y reparación del músculo esquelético dañado, previene la agregación y la apoptosis celular y favorece la mantención de la homeostasis en células musculares.

## **ABSTRACT**

The culture of skeletal muscle C2C12 cells responds to the depolarization of the membrane produced by electrical stimulation, generating a slow calcium signal. This produces an increase of the calcium concentration in the nucleus, mediated by the Inositol 1, 4, 5 - triphosphate receptor (IP3R), which activates transcriptional factors and regulates the expression of some early genes.

This research relates the protein synthesis in C2C12 cell culture with the generation of an intracellular slow calcium signal induced by electrical stimulation.

In this research it was used a C2C12 cell culture differentiated to myotubes, direct electrical stimulation and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). The gels were analyzed with the program Flicker; and the statistical analysis (Student's t test at 95% confidence) was performed with the program StatGraphics Plus 5.1<sup>TM</sup>. The identification of the protein spots was made by mass spectrometry (MS) and by searching in specialized databases (MASCOT, SwissProt, MS – Fit y ProFound).

The obtained results allowed the detection of significant changes in the protein expression of C2C12 cells as a response to electrical stimulation.

The differentially expressed protein was heat shock protein of 70KDa (Hsp70), which is involved in the response to the stress produced by electrical stimulation. This protein have an important role in protein metabolism, facilitating the regeneration and the repairing of damaged skeletal muscle, thus preventing aggregation and apoptosis, and favoring the homeostasis in muscle cells.

## 1 - INTRODUCCIÓN

El calcio es un mensajero intracelular que está involucrado en los procesos que conducen a la regulación génica en muchos tipos celulares.

En el caso del músculo esquelético, además de ser fundamental para el proceso de contracción, el calcio participa en las vías de señalización que relacionan la actividad muscular con la regulación de la expresión génica (Jaimovich y Carrasco, 2002).

Recientemente se ha descubierto que las células musculares responden a la despolarización de membrana mediante una señal de calcio bifásica (Jaimovich *et al.*, 2000).

La componente lenta de dicha señal corresponde a un aumento leve y más prolongado en la concentración intracelular de calcio. Esta señal está asociada al receptor de Inositol 1, 4, 5 – trifosfato (IP3R) y no estaría relacionada con el proceso de contracción.

Estudios recientes han demostrado que la señal lenta de calcio está involucrada en la expresión de ciertos genes tempranos, tales como c-fos y c-jun (Powell *et al.*, 2001; Jaimovich y Carrasco, 2002), lo que lleva a suponer que esta señal estaría involucrada en la síntesis diferencial de algunas proteínas en células musculares.

En este proyecto se propone estudiar la expresión y síntesis proteica en respuesta a estimulación eléctrica en cultivos de línea celular C2C12 diferenciado a miotubos, y relacionará por primera vez la síntesis de proteínas en células musculares en cultivo con la generación de la señal lenta de calcio intracelular inducida por estimulación eléctrica.

Se espera contribuir al avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica y en la síntesis proteica en células musculares en cultivo como respuesta a la estimulación eléctrica.



## 2 - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Señales de calcio en músculo esquelético

La depolarización de membrana en células musculares esqueléticas producida por actividad física o por estimulación eléctrica, conduce a una adaptación funcional asociada a hipertrofia, y la activación de mecanismos oxidativos. La depolarización de miotubos se traduce en un incremento bifásico de la concentración de calcio intracelular (Jaimovich *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2001; Araya *et al.*, 2003, Eltit *et al.*, 2004).

Las señales de calcio citoplasmáticas y nucleares son originadas por la liberación de calcio desde reservas internas, a través de canales mediados por receptores de rianodina (RyR) o receptores de Inositol trifosfato (IP3R). Las señales de calcio mediadas por RyR e IP3R presentan diferentes cinéticas (rápida y lenta), amplitudes (duración del incremento de la concentración de calcio) y localización subcelular (retículo sarcoplásmico y en la membrana nuclear) (Carrasco *et al.*, 2004). Estas señales de calcio constan de dos componentes: La señal rápida de calcio corresponde a un gran aumento en la concentración de calcio en el citoplasma a lo largo de todo el miotubo y tiene una duración de hasta 9 segundos. Se produce debido a la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma mediada por el receptor de rianodina y se asocia al proceso contráctil o al acoplamiento de excitación-contracción (Jaimovich *et al.*, 2000; Eltit *et al.*, 2004).

La señal lenta de calcio se manifiesta varios segundos después de la señal rápida, como una onda transitoria de menor amplitud y mayor longitud. El aumento en la concentración de calcio asociado a la señal lenta es menos drástico que el asociado a la señal rápida, y permanece por un período más largo de tiempo, cercano a los 100 segundos. La liberación de calcio asociada a la señal lenta está mediada por el receptor de Inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3R), que es responsable del aumento de la concentración de calcio en el núcleo (Jaimovich *et al.*, 2000). La señal lenta de calcio no está relacionada con el proceso de contracción muscular, sino más bien tendría un papel en la regulación de la expresión génica dada su importante componente nuclear (Powell *et al.*, 2001; Araya *et al.*, 2003).

## **2.2 - Señales de calcio asociadas al núcleo celular**

El calcio es un segundo mensajero en prácticamente todas las células y tejidos. Las señales de calcio en el núcleo tiene efectos sobre importantes de procesos celulares, incluyendo la transcripción génica, la diferenciación celular, el crecimiento y la apoptosis, presentando diferencias con las señales de calcio citosólicas (Echevarria *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2003).

El receptor de Inositol 1, 4, 5 - trifosfato (IP3R) está involucrado en la regulación de las señales de calcio al interior del núcleo (Jaimovich *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2001; Araya *et al.*, 2003; Echevarria *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2003).

Los receptores de IP3 se encuentran localizados en la membrana nuclear interna (Humbert *et al.*, 1996). Se han detectado altos niveles de IP3R en músculo esquelético y en la unión neuromuscular (NMJ), en áreas alrededor del núcleo (Powell *et al.*, 2003; Molgó *et al.*, 2004).

Previo a la generación de la señal lenta de calcio se produce un incremento transitorio en la masa de Inositol 1, 4, 5 – trifosfato (Carrasco *et al.*, 1997; Liberona *et al.*, 1998; Jaimovich *et al.*, 2000), lo que indica que dicha señal se genera a través de la liberación de calcio por los canales que responden a IP3, siendo ésta la respuesta fisiológica a las fluctuaciones en el potencial de membrana sensible al receptor de dihidropiridina (DHPR), el cual funciona normalmente en el músculo esquelético como un sensor del voltaje, descargando el calcio hacia el interior del núcleo (Jaimovich *et al.*, 2000; Araya *et al.*, 2003; Eltit *et al.*, 2004).

La señal lenta de calcio estaría involucrada en la activación de factores transcripcionales y en la consecuente regulación de la expresión génica (Humbert *et al.*, 1996; Jaimovich *et al.*, 2000; Jaimovich y Carrasco 2002; Carrasco *et al.*, 2003; Araya *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2003).

Se ha demostrado la existencia de receptores de IP3 en la envoltura nuclear, y se ha comprobado la producción de señales lentas de calcio en el núcleo de células musculares mediadas por IP3 (Cárdenas *et al.*, 2005).

### **2.3 - Cascadas transduccionales dependientes de calcio**

Se ha descrito recientemente que la depolarización de miotubos produce la activación de la cascada vía proteína quinasa que activa el gen MAPK/ERK, siendo el mayor sistema de señalización por el cual las células traducen señales extracelulares con respuestas intracelulares (Aronson *et al.*, 1997).

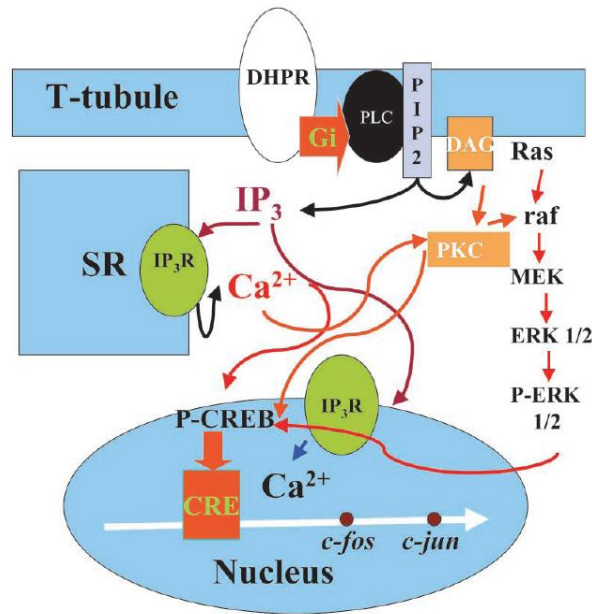
El tipo de respuesta transcripcional es determinada por las propiedades de la señal de calcio, tales como la localización subcelular, la amplitud, la duración y el sitio físico de entrada. La cascada proteína quinasa regulada por calcio es el mecanismo a través del cual la señal de calcio se propaga dentro del núcleo y controla la actividad de factores de transcripción y coactivadores transcripcionales (Cruzalegui *et al.*, 2000).

La depolarización de células de músculo esquelético induce una señal lenta de calcio mediada por el IP3R que regula el traspaso local de calcio y modula la respuesta de AMPc en la fosforilación de la proteína CREB (Powell *et al.*, 2001, Cárdenas *et al.*, 2005).

Tanto la activación de la proteína quinasa C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) como su traslocación al núcleo participan en la fosforilación de CREB inducida por depolarización (Carrasco *et al.*, 2003; Cárdenas *et al.*, 2004), eventos que dependen de la liberación de calcio por canales que responden a IP3.

Entre los eventos producidos por la depolarización de membrana en células C2C12 se encuentran:

- (a) Incremento transitorio de la masa de IP3 (2 - 10 s);
- (b) Traspaso lento de calcio (5-25seg) que se propaga como una onda lenta a lo largo del miotubo, mostrando un traspaso de calcio a nivel del núcleo celular en presencia de receptores de IP3 en el retículo sarcoplásmico, en la banda A, y en la envoltura nuclear;
- (c) Fosforilación de los genes ERK-1 y ERK-2 y del factor de transcripción CREB (30seg- 10min), así como la expresión de genes tempranos c-fos, c-jun y erg-1 a partir de mRNA (5-15min). (Jaimovich y Carrasco, 2002).



**Figura 1.** Modelo de las vías involucradas en la señalización de calcio mediada por IP3 y la regulación de la expresión de genes tempranos en células musculares.

La Figura 1 muestra el modelo de señalización por calcio mediada por IP3. El receptor de dihidropiridina (DHPR) presente en la membrana del túbulo T actúa como sensor de voltaje, interactuando con una proteína G (Gi) y activando la fosfolipasa C (PLC) para producir IP3 y diacilglicerol (DAG). El IP3 difunde hacia los receptores de IP3 localizados en ciertas regiones del retículo sarcoplásmico (SR) y en la envoltura nuclear, liberando calcio hacia el núcleo, activando factores de transcripción CREB y la expresión genética de los genes tempranos c – fos y c - jun (Araya *et al.*, 2003).

## **2.4 - Expresión génica asociada a la señal lenta de calcio**

El calcio nuclear es un importante regulador de la expresión génica a través de la depolarización de membrana de células excitables eléctricamente (Hardingham *et al.*, 1999).

El ejercicio físico produce cambios en la expresión génica de células musculares, relacionados con el metabolismo, respuesta al estrés y de regulación (Hildebrandt *et al.*, 2003); estos cambios adaptativos del músculo esquelético se traducen en una mayor eficacia metabólica (Pilegaard *et al.*, 2000).

La estimulación del músculo esquelético genera microdominios de calcio, los que activan vías de señalización y mecanismos moleculares que conducen a la transcripción de genes que participan en respuestas celulares específicas.

Estas vías de activación de factores de transcripción dependientes de calcio regulan la expresión de genes específicos o conjuntos de genes en neuronas o células de músculo esquelético (Carrasco e Hidalgo, 2006).

La respuesta de las células musculares y los patrones transcripcionales obtenidos son diferentes según las variaciones en la frecuencia y en la amplitud de la señal de calcio, así como la ubicación subcelular de la señal y la vía de entrada de calcio.

La señal lenta de calcio, mediada por IP<sub>3</sub> y asociada al núcleo, gatilla la expresión de genes tempranos como c-fos, c-jun y erg-1 (Powell *et al.*, 2001; Jaimovich y Carrasco, 2002; Carrasco *et al.*, 2004).

Recientemente se estudió el cambio en la expresión génica de células C2C12 sometidas a depolarización con potasio. Los resultados obtenidos permitieron identificar cambios significativos en la expresión de un número limitado de genes, ya sea aumentando o disminuyendo su nivel de transcripción. Por otra parte, se realizó un análisis de la clasificación funcional de los genes afectados, concluyéndose que aquellos que presentaron variaciones significativas en su expresión están relacionados al metabolismo, respuesta al estrés, comunicación celular y genes que codifican para proteínas estructurales (Juretic *et al.*, 2007).

### **3 - HIPÓTESIS**

En base a los antecedentes antes expuestos, la hipótesis planteada en ésta investigación fue que el patrón de síntesis de proteínas en células C2C12 en cultivo es modificado por la estimulación eléctrica directa.

### **4 - OBJETIVOS**

#### **4.1 - OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo fue investigar el efecto de la estimulación eléctrica sobre la síntesis de proteínas en células C2C12 en cultivo y su relación con la señal lenta de calcio.

#### **4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos específicos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

- Caracterizar los patrones de expresión proteica obtenidos al estimular eléctricamente células C2C12 en cultivo.
- Cuantificar la diferencia de concentración de las proteínas que se sintetizan diferencialmente en respuesta a estimulación eléctrica.
- Identificar las proteínas que son expresadas diferencialmente en cultivos de células musculares C2C12 como respuesta a estimulación eléctrica.

## **5 - MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 – Cultivo celular**

En este estudio se utilizó la línea celular C2C12, que corresponde a mioblastos de músculo esquelético de ratón; al alcanzar una confluencia del 80% se agregó medio diferenciador para obtener miotubos bien formados y con actividad contráctil.

### **5.2 - Diseño experimental.**

Se estimularon eléctricamente células C2C12 en cultivo de manera directa utilizando una frecuencia de 45 Hertz y 400 pulsos. Transcurrido un tiempo de expresión de 4 horas se obtuvo la fracción proteica de las células.

Se cuantificó las diferencias de expresión de cada proteína con respecto a la situación control a través del análisis proteómico por medio de geles de electroforesis bidimensional y el análisis de sus imágenes.

Finalmente se identificaron las proteínas por medio de espectrometría de masa y búsqueda en bases de datos de proteínas.

### **5.3 - Estimulación eléctrica:**

Las células fueron estimuladas eléctricamente siguiendo la metodología descrita por Eltit *et al.*, 2004. La estimulación eléctrica se realizó utilizando una frecuencia de 45 Hz, y una cantidad de 400 pulsos.

### **5.4 - Obtención del extracto de proteína total.**

El extracto de proteína total se obtuvo mediante la metodología implementada en el Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo (Araya *et al.*, 2003).

El tiempo de expresión corresponde al tiempo transcurrido entre la estimulación eléctrica y la obtención de la fracción proteína de las células. El tiempo de expresión considerado fue de 4 horas desde la estimulación.

### **5.5 - Cuantificación de Proteína.**

La determinación de proteína total de cada muestra se realizó por el método Hertree modificado, medida por colorimetría, determinada mediante espectrofotómetro y la cantidad de proteína total fue expresada en µg.

## 5.6 - Electroforesis Bidimensional

Los geles de electroforesis bidimensional se hicieron en el Laboratorio de Microbiología Molecular (sección Proteómica) perteneciente al Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se utilizó el protocolo para geles bidimensionales de proteínas descrito por O'Farrell *et al.*, 1977, el que se encuentra implementado en el Laboratorio de Microbiología Molecular.

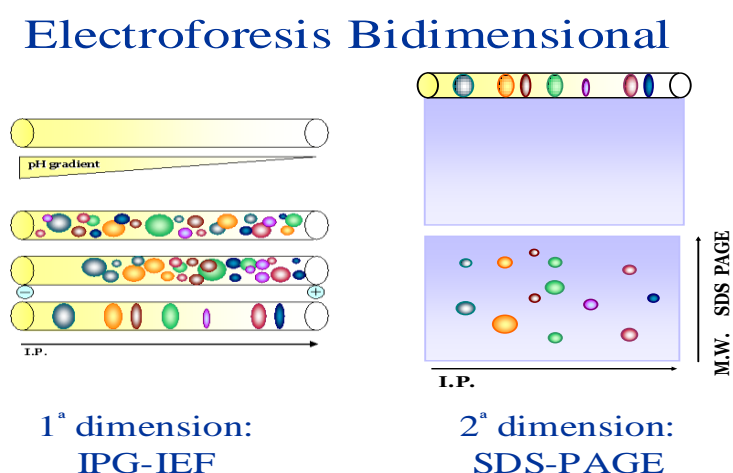
Cada condición experimental control y estimulado (triplicado) fue analizada por electroforesis bidimensional simultáneamente.

Para que los resultados fueran reproducibles y comparables en su análisis posterior se cargó cada gel con 300µg de proteína.

En la primera dimensión (isoelectroenfoque) las proteínas migraron hasta alcanzar su punto isoeléctrico (pI) y se separaron en el gel IEF entre un rango de pH entre 5- 7, y se usó un voltaje constante de 667 voltios durante 18 horas.

En la segunda dimensión las proteínas migraron y separaron según peso molecular (KDa), se realizó en un gel de poliacrilamida al 11.5% (2D-PAGE), y en esta etapa se usó un voltaje constante igual a 50 voltios durante 16 horas.

La Figura 2 muestra de manera esquemática las etapas en el análisis de electroforesis bidimensional.



**Figura 2.** Electroforesis Bidimensional.



### **5.7 - Tinción de geles 2D-PAGE**

Los geles 2D-PAGE fueron teñidos con azul de coomassie (Bollag *et al.*, 1994) y/o con nitrato de plata (Merril *et al.*, 1981). Ambas técnicas de tinción utilizadas son compatibles con la realización de espectrometría de masa (MS).

### **5.8 - Digitalización de imágenes de geles 2D-PAGE**

Los geles luego de teñidos y revelados fueron digitalizados mediante un escáner de alta resolución y las imágenes se analizaron utilizando el programa Flicker para análisis de geles 2D-PAGE.

### **5.9 - Análisis Estadístico**

Para detectar diferencias estadísticamente significativas en la expresión de proteínas en la condición experimental con respecto a la condición control, se compararon la intensidad relativa promedio de cada mancha de proteína utilizando el test de t- Student y se consideró un nivel de confianza de 95%.

Para este análisis estadístico se usó el programa StatGraphics Plus 5.1<sup>TM</sup>.

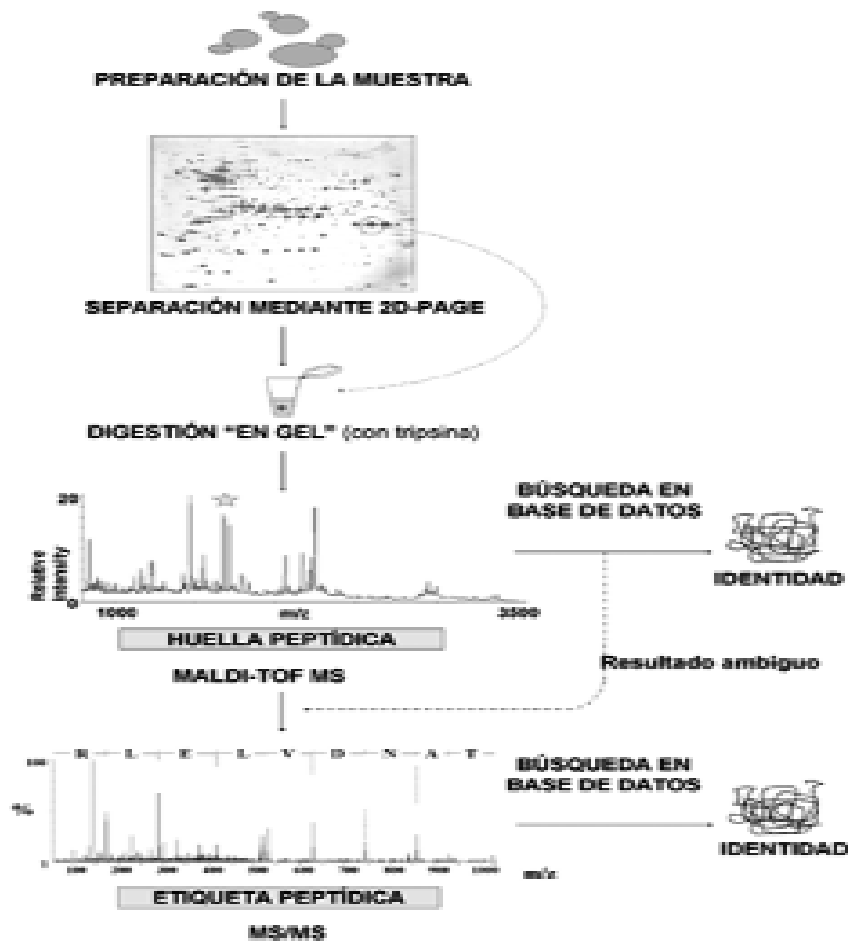
### **5.10 - Identificación de las proteínas de expresión diferencial**

Las manchas de interés fueron escindidas directamente del gel de electroforesis bidimensional y fueron enviadas a analizar mediante espectrometría de masas.

Este análisis se realizó en el equipo ESI - Ion Trap; éste servicio fue prestado por el CEPEDEQ, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Los espectros MS correspondientes a cada mancha de interés fueron buscados en la base de datos de proteínas de ratón perteneciente al National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando el programa MASCOT. Además se revisaron otras bases de datos no redundantes como: SwissProt, MS - Fit y ProFound en forma de confirmación y para obtención de datos de aquellas manchas proteicas no identificados.

La Figura 3 muestra de manera esquemática las etapas en el análisis e identificación de las proteínas de interés realizado mediante espectrometría de masa (MS).



**Figura 3.** Estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (Pitarch *et al.*, 2003).

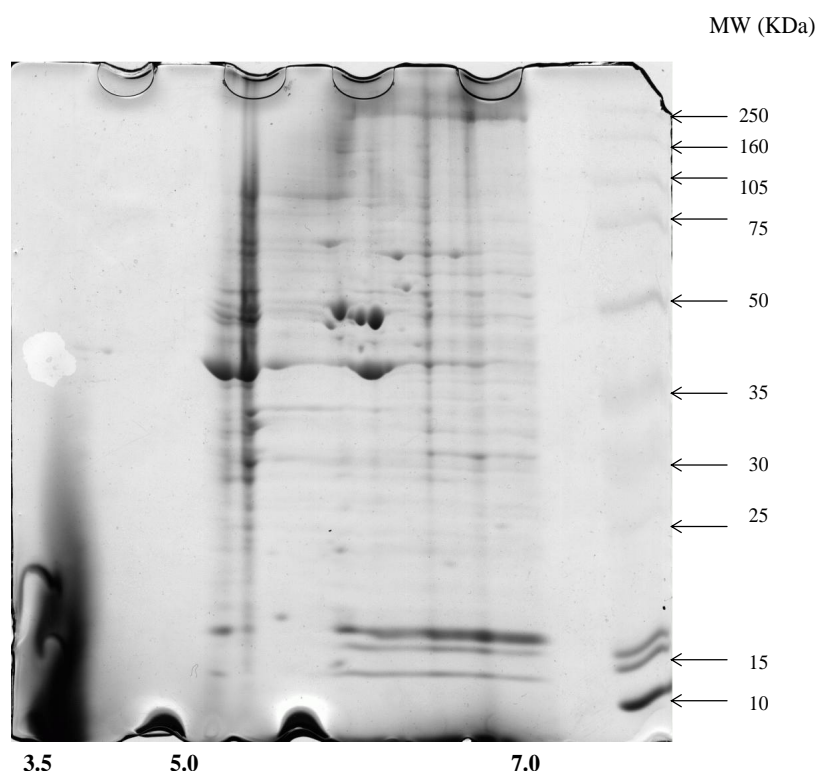
## 6- RESULTADOS

### 6.1- Caracterización del patrón de expresión proteica del cultivo celular línea C2C12

El extracto de proteína total del cultivo celular C2C12 se caracterizó a través de la realización de electroforesis bidimensional y obtención del gel 2D-PAGE.

La Figura 4 muestra el Perfil proteico o la distribución del extracto proteico del cultivo celular C2C12 para la condición control (sin estimulación eléctrica); teñido y revelado con azul de coomassie.

Al costado derecho del gel 2D-PAGE se indica el rango de migración proteica según la variante peso molecular (MW) en Kilodalton (KDa), ubicándose las manchas proteicas de interés a analizar entre 35 KDa y 75 KDa. Debajo del gel 2D-PAGE se indica el rango de migración proteica según su punto isoeléctrico (pI), ubicándose las manchas proteicas de interés a analizar entre un rango de pH de 5 a 7.

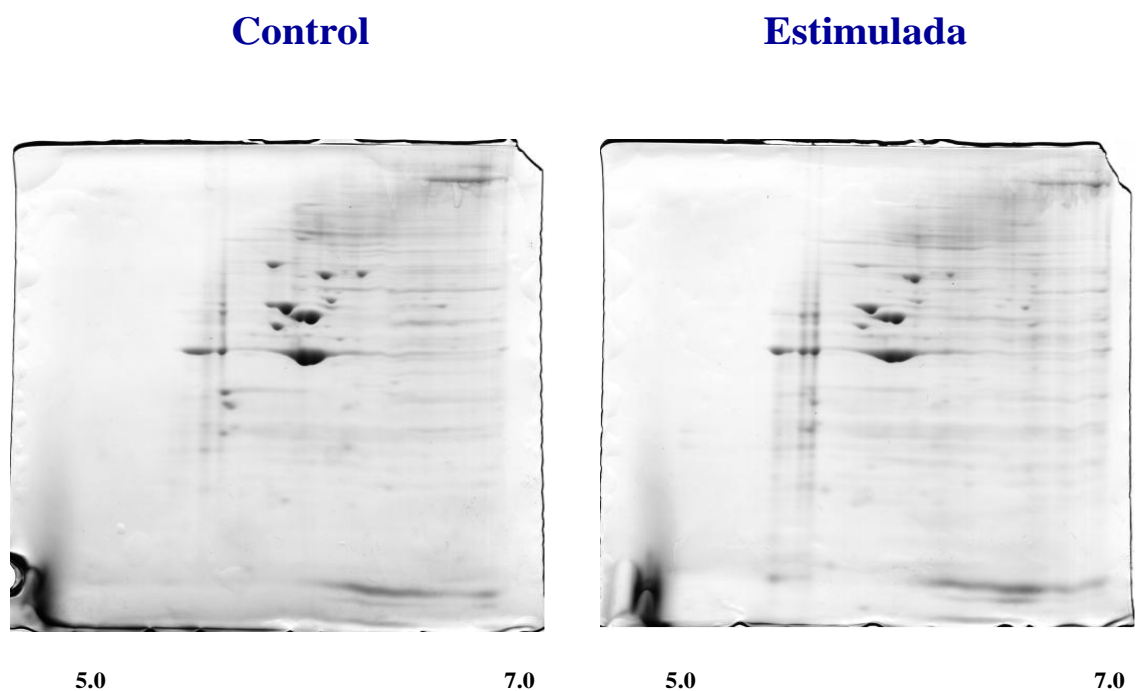


**Figura 4.** Gel de electroforesis bidimensional 2D-PAGE. Perfil proteico o la distribución del extracto proteico (300  $\mu$ g) del cultivo celular C2C12 Control (sin estimulación eléctrica). Tinción azul de coomassie.

## 6.2 - Comparación de los patrones proteicos

Se procedió a la migración y separación de proteínas por medio de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE); se realizó la tinción de los geles de electroforesis bidimensional 2D-PAGE control y electroestimulado con azul de coomassie y posteriormente con nitrato de plata compatible con MS, y fueron digitalizados por scáner para analizar su imagen.

La Figura 5 muestra las imágenes de un gel control y un gel correspondiente a la condición estimulada teñidos con azul de coomassie.

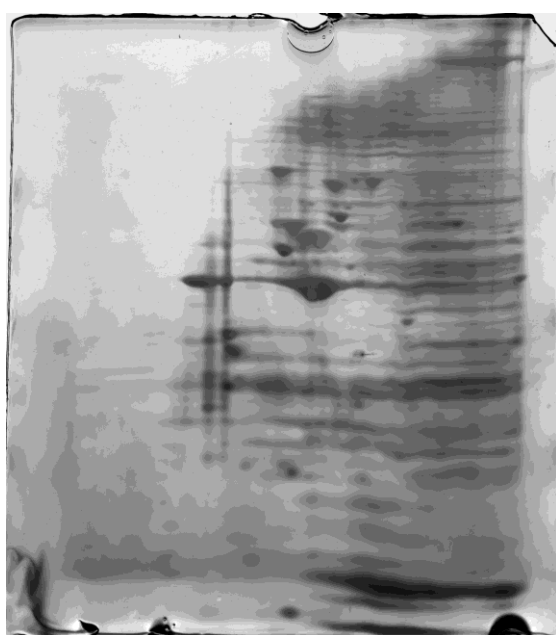


**Figura 5.** Geles 2D-PAGE control y estimulado. Tinción azul de coomassie.

La Figura 6 muestra las imágenes de los geles 2D-PAGE control y electroestimulado teñidos con nitrato de plata.

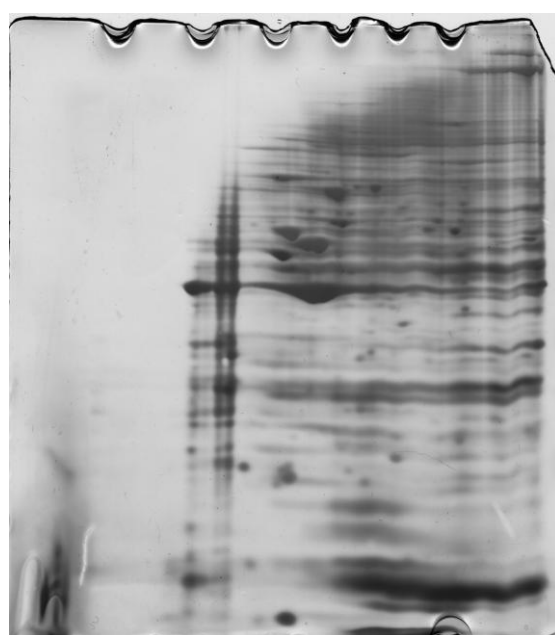
**Control**

**Estimulada**



5.0

7.0



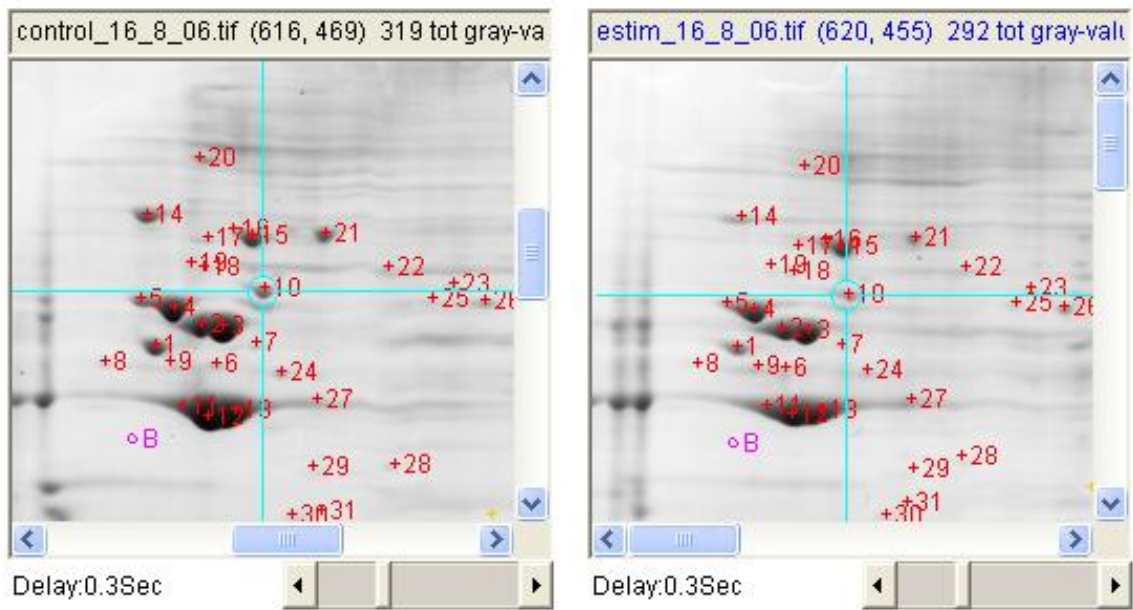
5.0

7.0

**Figura 6.** Geles 2D-PAGE control y estimulado. Tinción nitrato de plata.

### 6.3 - Análisis de las imágenes

La Figura 7 muestra marcación (nº) de manchas proteicas (1- 31) en las imágenes de los geles correspondientes a las condiciones control y estimulada para su posterior análisis por medio del programa Flicker para geles 2D-PAGE.

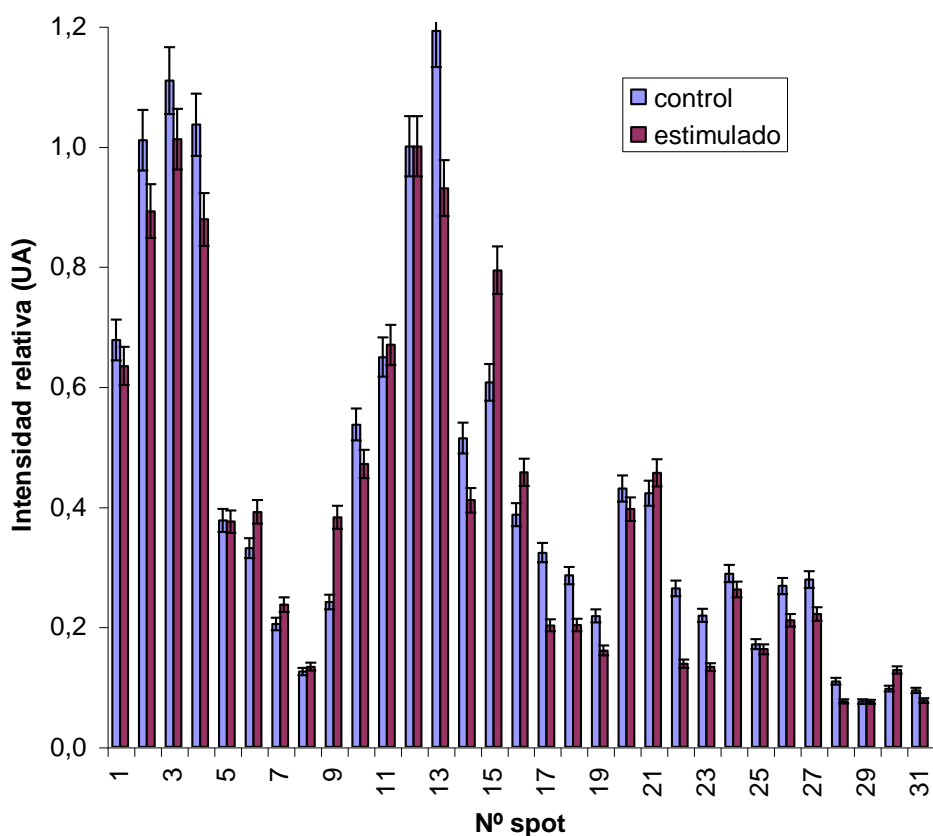


**Figura 7.** Marcación o numeración (nº) de manchas (1- 31) para análisis por medio del programa Flicker para geles 2D-PAGE.

Se realizó la normalización de las imágenes de los geles 2D-PAGE para hacer posible la comparación entre geles. Cada mancha proteica o spot se analizó a partir de la intensidad relativa en unidades arbitrarias (UA).

En esta comparación entre geles control y estimulado se observa el cambio en la expresión proteica (aumento y/o disminución) atribuibles a la estimulación eléctrica. La intensidad promedio de las manchas numeradas fue cuantificada para el posterior análisis estadístico.

La Figura 8 muestra el análisis comparativo de las manchas proteicas detectadas en las dos condiciones.



**Figura 8.** Análisis de manchas proteicas (nº spot) comparando geles 2D-PAGE control y estimulado eléctricamente a partir de la intensidad relativa (UA).

La Tabla 1 muestra el análisis estadístico para cada mancha proteica y determinación de diferencias estadísticamente significativas.

Se comparó la intensidad promedio de cada mancha, en las dos condiciones (control y estimulada). Los valores corresponden al promedio de tres réplicas. En la tabla se ha destacado la mancha número 15, ya que es la única que presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su expresión.

N° spot	CONTROL		ESTIMULADO		p-value
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	
1	0,6776	0,0827	0,6341	0,0912	0,574
2	1,0098	0,1661	0,8921	0,0665	0,318
3	1,1095	0,2390	1,0118	0,0448	0,525
4	1,0359	0,2377	0,8783	0,0798	0,337
5	0,3770	0,1608	0,3751	0,0232	0,985
6	0,3312	0,1221	0,3914	0,1405	0,605
7	0,2044	0,0875	0,2370	0,0536	0,613
8	0,1255	0,0209	0,1334	0,0924	0,893
9	0,2412	0,0556	0,3826	0,1235	0,145
10	0,5369	0,1279	0,4712	0,0885	0,505
11	0,6491	0,1014	0,6694	0,0306	0,756
12	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	-
13	1,1920	0,3553	0,9304	0,0485	0,275
14	0,5141	0,0851	0,4107	0,0776	0,195
<b>15</b>	<b>0,6071</b>	<b>0,0931</b>	<b>0,7935</b>	<b>0,0289</b>	<b>0,03</b>
16	0,3867	0,1752	0,4572	0,0412	0,535
17	0,3233	0,2330	0,2024	0,0834	0,445
18	0,2852	0,1914	0,2030	0,0372	0,506
19	0,2177	0,0516	0,1605	0,0455	0,223
20	0,4303	0,1530	0,3959	0,1627	0,803
21	0,4226	0,1131	0,4565	0,1095	0,727
22	0,2637	0,0705	0,1387	0,1220	0,199
23	0,2187	0,1621	0,1331	0,0512	0,432
24	0,2886	0,0718	0,2620	0,0429	0,611
25	0,1710	0,0589	0,1625	0,0191	0,823
26	0,2681	0,1543	0,2106	0,1795	0,696
27	0,2787	0,1262	0,2211	0,1407	0,625
28	0,1092	0,0462	0,0757	0,0362	0,379
29	0,0756	0,0440	0,0749	0,0649	0,998
30	0,0970	0,0330	0,1280	0,1182	0,684
31	0,0940	0,0383	0,0774	0,0686	0,733

**Tabla 1.** Análisis estadístico para cada mancha proteica. La mancha n° 15 presenta una diferencia estadísticamente significativa.



#### **6.4 - Identificación de la proteína de expresión diferencial**

La mancha de interés fue escindida directamente desde el gel y enviada a analizar mediante espectrometría de masas (MS).

La proteína de expresión diferencial (mancha nº 15) se identificó mediante espectrometría de masas (MS) como proteína de estrés calórico de 70 KDa o Hsp 70.

### **7 - DISCUSION**

Los resultados obtenidos de esta investigación permitieron identificar cambios significativos en la expresión proteica de células musculares C2C12 sometidas a estimulación eléctrica.

La proteína expresada diferencialmente fue la proteína de estrés calórico de 70KDa o Hsp70, aumenta su expresión en respuesta al estrés producido por la estimulación eléctrica y cumple un importante rol en el metabolismo proteico, facilita la regeneración y reparación del músculo esquelético dañado, previene la agregación y la apoptosis celular, y favorece la homeostasis en células musculares.

#### **7.1 - Proteínas de estrés calórico**

Las proteínas de estrés calórico (Hsp) corresponden a un grupo de proteínas cuya expresión se ve aumentada cuando las células son expuestas a elevadas temperaturas u otros tipos de stress (Infección, inflamación, hipoxia, exposición a toxinas, metales pesados, luz UV) y son parte del sistema de homeostasis y reparación propia de la célula.

Las proteínas de estrés calórico también se presentan en condiciones fisiológicas normales y no estresantes, están involucradas en el crecimiento y diferenciación celular (Ito *et al.*, 2001); y sus niveles se incrementan durante el entrenamiento físico, presentándose niveles menores en animales sedentarios (González *et al.*, 2000).

La Hsp70 en músculo esquelético humano aumenta su expresión en respuesta al entrenamiento físico de resistencia, y depende de la intensidad y duración del ejercicio (Liu *et al.*, 2000; Milne y Noble 2002).

Las Hsp tienen actividad de chaperonas en varios procesos intracelulares y son denominadas según su peso molecular (KDa): Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y Hsp33 y las pequeñas Hsp.

Las Hsp son chaperonas moleculares y juegan un importante papel en las interacciones proteína – proteína, tales como el plegamiento, colaboran en el transporte de las proteínas dentro de la célula a través de las membranas, permiten el establecimiento de una conformación apropiada en proteínas recién sintetizadas y actúan en la prevención de una agregación indeseada; además cuando las proteínas están viejas las lleva al ciclo de reciclaje de la célula.

En esta investigación se determinó un aumento en la expresión de HSP70 en las células musculares, como respuesta al estrés producido por la estimulación eléctrica. Se comprobó que la síntesis diferencial está relacionada con la señal lenta de calcio, aumentando la concentración de calcio en el núcleo mediada por el receptor de Inositol 1, 4, 5 - trifosfato (IP3R), activando factores transcripcionales y regulando la traducción.

## **7.2 - Estructura y función de la HSP70**

Las Hsp 70 tienen tres dominios funcionales principales:

- 1) Dominio N-termin 1 ATPasa, hidroliza el ATP (Adenosintrifosfato) en ADP (Adenosindifosfato), el cambio que conduce a una transformación conformacional en los otros dos dominios.
- 2) Dominio que liga sustrato, tiene una ranura con afinidad con los residuos de aminoácidos neutros e hidrofóbicos, interactuando con péptidos de más de 7 residuos aminoacídicos de longitud.
- 3) Dominio C-terminal rico en estructuras  $\alpha$ helicoidales que actúa como “tapa” para el dominio que liga sustrato. Cuando una proteína Hsp70 está asociada a ATP esta tapa se abre, los péptidos unen al dominio que liga sustrato y cuando una proteína Hsp70 está asociada a ADP la tapa se cierra.

A medida que las proteínas recién sintetizadas emergen de los ribosomas, el dominio que liga sustrato de la Hsp70 reconoce residuos aminoacídicos hidrófobos e interactúa con ellos; esta interacción espontánea es reversible y en el estado asociado a ATP de la Hsp70 puede ligar y liberar péptidos.

Sin embargo la presencia de un péptido en el dominio que liga estimula la actividad ATPasa de la Hsp70, cuando el ATP es hidrolizado a ADP, el lugar de unión se cierra, ligando fuertemente la ahora atrapada cadena de péptidos.

La Hsp70 previene que los péptidos parcialmente sintetizados se agreguen y/o inactiven funcionalmente., luego la proteína es liberada para ser plegada, ser conducida o transferida a otras chaperonas para procesamientos posteriores.

### **7.3 - Rol de las Hsp70 en células músculoesqueléticas**

Las proteínas de estrés calórico aumentan su expresión en respuesta al estrés producido por la estimulación eléctrica y cumple un importante rol en el metabolismo proteico y manteniendo la homeostasis la celular.

Estas chaperonas moleculares actúan en la síntesis proteica, el transporte, el ensamble proteico, el plegamiento, el mantenimiento conformacional, la degradación y en la protección y supervivencia celular (Locke y Noble 1995).

Las proteínas Hsp70 tienen efecto citoprotector en células musculares al proteger las células del estrés oxidativo o calórico (Frier *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2004; Mc Ardle *et al.*, 2004) y al daño producido por isquemia-reperfusión (Lepore *et al.*, 2001; Maglara *et al.*, 2003; Tarricone *et al.*, 2006).

Los factores estresantes dañan las proteínas, causando un desplegamiento parcial y una posible agregación, la Hsp70 previene la agregación de las proteínas parcialmente denaturadas uniéndose temporalmente a los residuos hidrofóbicos expuestos por el stress y permite que se replieguen.

La Hsp70 participa en la restauración de las proteínas defectuosas y/o dañadas, previene la apoptosis y favorece la homeostasis en células musculares (Frier *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006; Maglara *et al.*, 2003).

El estrés calórico al aumentar la expresión de las Hsp facilita la regeneración y reparación del músculo esquelético dañado en tejidos adultos y favorece a la proliferación y diferenciación de mioblastos, pudiendo mejorar el potencial proliferativo a partir de una recuperación significativa en cuanto al nivel y síntesis proteica ( Kojima *et al.*, 2007).

#### **7.4 - Enfermedades relacionadas con HSP70**

La capacidad de músculo esquelético en mamíferos adultos para regenerarse al daño se debe a la presencia de precursores de células miogénicas mononucleares indiferenciadas (células satélites) y fibras musculoesqueléticas maduras periféricas; además de la expresión de factores del control transcripcional de Heat Shock Factor HSF1-2.

En la senescencia la participación defectuosa de la Hsp70 contribuye al envejecimiento y a la presentación de varias enfermedades.

Así una anormal activación de HSF1 puede jugar un rol determinante en la regeneración defectiva en animales viejos, viéndose atenuada la producción de HSP en respuesta al stress y disminuida la capacidad de recuperación muscular (Mc Ardle *et al.*, 2006).

El entrenamiento físico de resistencia incrementa el nivel de Hsp70 en el músculo de animales jóvenes y viejos, además los datos son consistentes con la hipótesis que altos niveles de estrés oxidativo en el músculo de animales viejos limita los niveles de Hsp y/ o su función en respuesta al estrés (Jackson *et al.*, 2004; Kayani *et al.*, 2008; Mc Ardle *et al.*, 2004; Muriasits *et al.*, 2006).

Las Hsp están involucradas en la reparación o regeneración de fibras musculares y sus bajos niveles están asociados a enfermedades neuromusculares, distrofias y enfermedades neurodegenerativas.

Las respuestas adaptativas al ejercicio en músculo y el nivel de HSP presentaron una reducción, al igual que una falla la activación de los factores de transcripción en animales viejos (Vasilaki *et al.*, 2006; Muriasits *et al.*, 2006).

Dentro de las enfermedades neuromusculares de mayor presentación estan las Miositis inflamatorias ideopáticas (MII) y es la miopatía más común en personas mayores de 50 años de edad (Macario *et al.* 2005).

Dentro de las enfermedades neurodegenerativas muchas son causadas por proteinopatías donde las proteínas se denaturan pasando a ser tóxicas para la célula, promoviendo la agregación y la apoptosis.

La Tabla 2 muestra un listado con enfermedades relacionadas con HSP70.

<b>Neuromusculares - Miositis inflamatorias ideopáticas (MII)</b>
Miositis con Cuerpo de Inclusión (IBM)
Polimiositis (PM)
Dermatomiositis (DM)
Miositis miofibrilar (MM)
Miastemia Gravis (MG)
<b>Neurodegenerativas - Proteinopatías</b>
Enfermedad de Alzheimer,
Enfermedad de Parkinson
Encefalopatía Espongiforme Transmisible (EET)
Ataxia Espinocerebelosa tipo 1 (SCA-1)
Distrofia Muscular Oculofaríngea (OPMD)
Enfermedad de Huntington
Esclerosis Lateral Amiotrófica o enfermedad de Lou Gehrig
Esclerosis Múltiple Crónica idiopática
Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
Neuropatía Motora Multifocal
Polineuropatía inflamatoria Desmielinizante
Distrofia Muscular Congénita de Mulrich (VCMD)
Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)
Atrofia Muscular Espinal y Atrofia Muscular Bulbar
Síndrome Miastémico de Lambert – Eaton

**Tabla 2.** Enfermedades neuromusculares y enfermedades neurodegenerativas asociadas a Hsp70.

## 7.5 - Terapias y tratamientos en enfermedades neuromusculares

La fatiga muscular se produce en muchas enfermedades neuromusculares, incluyendo las distrofias musculares, ésta se produce por la alteración en los procesos adaptativos en respuesta al ejercicio por sobrecarga y estrés.

Estos resultados contribuyen al estudio de patologías neuromusculares y terapias tendientes a favorecer la capacidad funcional y mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados.

La Hsp70 tiene un importante rol en la adaptación muscular, en la recuperación de músculos atrofiados y en el proceso de hipertrofia compensatoria

(Frier *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2004; Locke *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2003).

En la Tabla 3 se presentan algunas terapias para el tratamiento de estas enfermedades proteinogénicas.

<b>Estimulación de la sobreexpresión de Hsp70</b>
La Hsp70 participa en la restauración de las proteínas defectuosas y/o dañadas, previene la apoptosis y favorece la homeostasis en células musculares. (Frier <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2006; Maglara <i>et al.</i> , 2003). Se puede estimular de la sobreexpresión de Hsp70 por medio de estrategias terapéuticas como terapias térmicas, estimulación eléctrica o entrenamiento físico; induciendo la hipertrofia compensatoria en distrofias musculares.
<b>Terapias farmacológicas</b>
Administración de Bis (THIO-hidrazida amidas) para estimular de la sobreexpresión de Hsp70 como uso en tratamiento de enfermedades neuromusculares. (Nosek, 2000).
<b>Terapias alternativas y complementarias</b>
Fisioterapia, Hidroterapia, Termoterapia, Talasoterapia, Acupuntura, Zooterapia (hipoterapia), Flores de Bach y Homeopatía.

**Tabla 3.** Terapias para enfermedades proteinogénicas relacionadas con HSP70.

Alguna o la combinación de estas terapias son muy prometedoras para el tratamiento de enfermedades neuromusculares, mejorando la capacidad funcional y la calidad de vida de los pacientes afectados.

## 8. - CONCLUSIONES

Esta Memoria de Título describe la investigación sobre la expresión y síntesis proteica en respuesta a estimulación eléctrica en cultivos de línea celular C2C12 diferenciados a miotubos, y relaciona por primera vez la síntesis de proteínas en células musculares en cultivo con la generación de la señal lenta de calcio intracelular inducida por estimulación eléctrica. La información obtenida y metodología utilizada permitió la identificación de nuevas proteínas, esclareciendo interacciones, señalización, mecanismos y vías metabólicas implicadas en transducción de señales.

Se logró estandarizar los protocolos de electroforesis bidimensional y técnicas de tinción coomassie y nitrato de plata compatibles con MS, y se caracterizaron los patrones de expresión proteica del cultivo celular C2C12.

Los resultados obtenidos permitieron identificar cambios significativos en la expresión proteica de células musculares C2C12 sometidas a estimulación eléctrica, y corroborar que la señal lenta de calcio está involucrada en la síntesis diferencial de proteínas en células musculares; siendo la proteína expresada diferencialmente la proteína de estrés calórico de 70 KDa (Hsp70).

La Hsp70 o proteína de estrés calórico de 70 KDa aumentó su expresión como resultado del estrés producido por la estimulación eléctrica. Esta proteína cumple un importante rol en el metabolismo proteico, facilita la regeneración y reparación del músculo esquelético dañado, previene la agregación y la apoptosis y favorece la homeostasis en células musculares.

## 9. - BIBLIOGRAFÍA:

**Araya R., Liberona JL., Cárdenas JC., Riveros N., Estrada M., Powell JA., Carrasco MA., Jaimovich E.** (2003). Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization – evoked, IP<sub>3</sub>R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *J. Gen. Physiol.* 121: 3-16.

**Aronson D., Dufrense SD., Goodyear LJ.** (1997). Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 99(6): 1251-1257.

**Bollag D., Rozycki M., Edelstein S.** (1994). Staining a gel with Coomassie Blue. *Protein Methods* 5: 126-128.

**Cárdenas C., Müller M., Jaimovich E., Pérez F., Buchuk D., Quest AFG., Carrasco MA.** (2004). Depolarization of skeletal muscle cells induces phosphorylation of cAMP response element binding protein via calcium and protein kinase C $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 279 (37): 39122- 39131.

**Cárdenas C., Liberona JL., Molgó J., Colasante C., Mignery G., Jaimovich E.** (2005). Nuclear inositol 1,4,5-triphosphate receptors regulate local Ca<sup>2+</sup> transient and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *J. Cell Sci.* 118: 3131-3140.

**Carrasco MA., Marambio P., Jaimovich E.** (1997). Changes in IP<sub>3</sub> metabolism during skeletal muscle development in vivo and in vitro. *Comp Biochem Physiol. Biochem Mol Biol.* 116 (2):173-81.

**Carrasco MA., Riveros N., Rios J., Müller M., Torres F., Pineda J., Lantadilla S., Jaimovich E.** (2003). Depolarization – induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: C1438- C1447.

**Carrasco MA., Jaimovich E., Kemmerling U., Hidalgo C.** (2004). Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells. *Biol Res.* 37(4): 701-712.

**Carrasco MA., Hidalgo C.** (2006). Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells. *Cell Calcium.* 40 (5-6): 575-583.

**Cruzalegui FH., Banding H.** (2000). Calcium regulated protein kinase cascades and their transcription factor targets. *Cell Mol. Sci.* 57: 402- 410.

**Echevarría W., Leite MF., Guerra MT., Zipfel W., Nathanson MH.** (2003). Regulation of calcium signal in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 440- 446.



**Eltit JM., Hidalgo J., Liberona JL., Jaimovich E.** (2004). Slow calcium signals after tetanic stimulation in skeletal myotubes . *Biophys. J.* 86: 3042- 3051.

**Frier B., Locke M.** (2007). Heat stress inhibits skeletal muscle hypertrophy. *Cell Stress & Chaperones.* 12 (2): 132-141.

**González B., Hernando R., Manso R.** (2000). Stress proteins of 70 KDa in chronically exercised skeletal muscle. *Pfugers Arch.* 440 (1): 42-49.

**Goto K., Honda M., Kobayashi T., Uehara K., Kojima A., Akema T., Sugiuria T., Yamada S., Ohira Y., Yoshioka T.** (2004). Heat stress facilitates the recovery of atrophied soleus muscle in rat. *Jpn J. Physiol.* 54 (3): 258-293.

**Hardingham GE., Bading H.**(1999). Calcium as a versatile second messenger in the control of gene expression. *Microsc. Res.* 46: 348- 355.

**Hildebrandt AL., Pilegaard H., Neuffer PD.** (2003). Differential transcriptional activation of select metabolic genes in response to variations in exercise intensity and duration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E1021- E1027.

**Humbert JP., Matter N., Artault JC., Koppler P., Malviya AN.** (1996). Inositol 1,4,5 triphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by Inositol 1,4,5 triphosphate. Discrete distribution of Inositol 1,4,5 triphosphate receptor to inner and outer nuclear membranes. *J. Biol. Chem.* 271 (1): 478- 485.

**Ito H., Kamei K., Iwamoto I., Inaguma Y., Kato K.** (2001). Regulation of the levels of heat shock proteins during differentiation of C2C12 cells. *Exp Cell Res.* 226 (2): 213- 221.

**Jackson M., Khassaf M., Vailaki A., Mc Ardle F., Mc Ardle A.** (2004). Vitamin E and the Oxidative Stress of Exercise. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1031 (1): 158- 168.

**Jaimovich E., Reyes R., Liberona JL., Powell JA.** (2000). IP<sub>3</sub> receptors , IP<sub>3</sub> transients and nucleus-associated Ca<sup>2+</sup> signals in cultured skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 272: C998- C1010.

**Jaimovich E., Carrasco MA.** (2002). IP<sub>3</sub> dependent Ca<sup>2+</sup> signal in muscle cells are involved in regulation of gene expression . *Biol. Res.* 35: 195- 202.

**Juretic N., Urzua U., Munroe DJ., Jaimovich E., Riveros N.** (2007).Differential gene expresión in skeletal muscle cells after membrane depolarization. *J. Cell Physiol.* 210(3): 819-830.

- Kayani A., Close G., Jackson M., Mc Ardle A.** (2008). Prolonged treadmill training increases HSP70 in skeletal muscle and age- related functional deficits. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp.* 294(2): 568- 576.
- Kojima A., Goto K., Morioka S., Naito T., Akema T., Fujiya H., Sugiura T., Oshira Y., Beppu M., Aoki H., Yosioka T.** (2007). Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J. Orthop. Sci.* 12 (1): 74- 82.
- Leite MF., Thrower EC., Echavarria W., Koulen P., Hirata K., Bennett AM., Ehrlich BE., Nathanson MH.**(2003). Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 100(5): 2975- 2980.
- Lepore DA., Knight KR., Anderson RL., Morrison WA.** (2001). Role of priming stresses and Hsp70 in protection from ischemia- reperfusion injury in cardiac and skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones* 6 (2): 93- 96.
- Liberona JL., Powell JA., Shenoi S., Petherbridge L., Caviedes R., Jaimovich E.** (1998). Differences in both Inositol 1,4,5 triphosphate mass and Inositol 1,4,5 triphosphate receptors between normal and dystrophic skeletal muscle cell lines. *Muscle Nerve* 21: 902- 909.
- Liu Y., Lormes W., Baur C., Opitz-Gress A., Altenburg D., Lehmann M., Steinacker JM.** (2000). Human skeletal muscle Hsp70 response to physical training depends on exercise intensity. *Int J. Sports Med.* 21 (5): 351- 355.
- Liu Y., Gampert L., Nething K., Steinacker JM.** (2006). Response and function of skeletal muscle Heat shock protein 70. *Front Biosci.* 11: 2802- 2827.
- Locke M., Noble EG.** (1995). Stress Proteins: The exercise response. *Canada J. Appl. Physiol.* 20 (2): 155- 167.
- Locke M.** (2007). Heat shock protein accumulation and heat shock transcription factor activation in rat skeletal muscle during compensatory hypertrophy. *Cell Stress Chaperones* 5 (1): 45- 51.
- Macario AJ.** (2005). Chaperones, estrés celular y la enfermedad. *N. Engl. J. Med.* 353 (14) :1489-501.
- Maglara A., Vasilaki A., Jackson M., Mc Ardle A.** (2003). Damage to developing mouse skeletal muscle myotubes in culture: protective effect of heat shock proteins. *J. Physiol.* 548 (3): 837- 846.
- Mc Ardle F., Spiers S., Aldemir H., Vailaki A., Beaver A., Iwanejko LM., Mc Ardle A., Jackson M.** (2004). Preconditioning of skeletal muscle against contraction – induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. *J. Physiol.* 561 (1):233- 244.
- Mc Ardle A., Broome C., Kayani A., Tully M., Close G., Vasilaki A., Jackson M.** (2006). Hsf expression in skeletal muscle during myogenesis: Implications for failed regeneration in old mice. *Exp. Gerontol.* 41 (5): 497- 500.

- Merril CR., Goldman D., Sedman SA & Ebert MH.** (1981). Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gels shows regional variation. *Science* 211: 1437-8 .
- Milne K., Noble E.** (2002). Exercise – induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J. Appl. Physiol.* 94 (2): 561- 568.
- Molgó J., Colosante C., Adams DS., Jaimovich E.** (2004). IP<sub>3</sub> receptors and Ca<sup>2+</sup> signals in adult skeletal muscle satellite cells in situ. *Biol. Res.* 37(4):635-639.
- Muriasits Z., Citlip R., Geronilla K., Wonderlin W., Alway S.** (2006). Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. *Exp. Gerontol.* 41 (4): 398- 406.
- Nosek T., Brotto MA., Essing DA., Mestril R., Conover R., Dillmann W., Kolbeck R.** (2000). Functional properties of skeletal muscle from transgenic animals with upregulated heat shock protein 70. *Physiol Genomics* 4 (1): 25-33.
- O'Farrell P.Z., Goodman H.M., O'Farrell P.H.** (1977). High Resolution two - Dimensional electrophoresis of proteins . *Cell* 12 (4): 1133-41.
- Pilegaard H., Ordway GA., Saltin B., Neufer PD.** (2000). Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol. Endocrinol. Metab.* 279(4): E806- 814.
- Pitarch A., Sánchez, Nombela, Gil.**(2003). Analysis of the *Candida albicans* proteome. Strategies and applications. *J.Chromatography* 787: 101-128.
- Powell JA., Carrasco MA., Adams D.S., Drouet B., Rios J., Müller M., Estrada M., Jaimovich E.** (2001). IP<sub>3</sub> receptor function and localization in myotubes : An unexplored Ca<sup>2+</sup> signalling pathway in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 114: 3673 – 3683.
- Powell JA., Molgó J., Adams DS., Colosante C., Williams A., Bohlen M., Jaimovich E.** (2003). IP<sub>3</sub> receptors and associated Ca<sup>2+</sup> signals localize to satellite cells and to components of the neuromuscular junction in skeletal muscle. *J. Neurosci.* 23 (23): 8185 – 8192.
- Tarricone, Ghirardello, Zampieri, Doria, Gorza.**(2007).Cell stress response in Skeletal Muscle Miofibers. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1069 (1):472- 476.
- Thompson H., Maynard E., Morales E., Scordilis S.** (2003). Exercises-induced Hsp27 , Hsp70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 178(1): 61- 72.
- Vailaki A., Mc Ardle F., Iwanejko LM., Mc Ardle A.** (2006). Adaptive responses of mouse skeletal muscle to contractile activity: The effect of age. *Mech. Ageing Dev.* 127(11): 830- 839.