

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**PAPEL DEL IP_3R EN LOS CAMBIOS DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO MCU INDUCIDA POR
ESTÍMULO ELÉCTRICO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO ADULTO**

ESTEBAN ROQUE QUEZADA CORNEJO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN FISIOLÓGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dra Mariana Casas Atala

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

ESTEBAN ROQUE QUEZADA CORNEJO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de Noviembre del 2018.

**Prof. Dra. Mariana Casas Atala
Director de Tesis**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Nevenka Juretic

Prof. Dra. Valentina Parra

**Prof. Dra. Gina Sánchez
Presidente Comisión**

El presente trabajo está dedicado a mi familia por haber sido mi gran apoyo. A todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

A Monique, mi amor, por entenderme, escucharme y estar ahí en todos los momentos.

Agradecimiento

Gracias Dr. Enrique Jaimovich y Dra. Mariana Casas, por abrirme las puertas de su laboratorio, por haberme guiado y brindado el apoyo necesario para ser un mejor profesional.

Gracias Dr. Alexis Díaz-Vegas, por tomarte el tiempo para explicarme desde lo más básico de un laboratorio hasta los pasos más complejos. Eres un gran amigo Alexis y siempre recordaré cada uno de tus consejos.

Gracias a todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo, por las conversaciones, críticas, consejos y momentos chistosos que vivimos.

En verdad, muchas gracias a todos, son los mejores!

Índice

Resumen	5
Abstract	6
Abreviaturas	7
Introducción	9
Plasticidad muscular	9
Plasticidad muscular y frecuencia de estimulación	10
Papel del Ca ²⁺ en la plasticidad muscular	11
Papel de IP ₃ R en la plasticidad muscular	12
Mitocondria y músculo esquelético	13
Uniportador de calcio mitocondrial (MCU) y función muscular	15
Hipótesis	19
Objetivo General	19
Objetivo Específico	19
Materiales y Métodos	20
Cultivos celulares	20
Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR)	21
Estimulación eléctrica de campo	21
Determinación del papel de la vía IP ₃ /IP ₃ R	22
Análisis estadístico	22
Etapas del trabajo	22
Resultados	22
Discusión	33
Conclusión	40
Referencias	41

Resumen

La plasticidad muscular es la capacidad que presentan las células musculares esqueléticas de adaptarse a diferentes estímulos externos, modificando su fenotipo. La frecuencia de estimulación eléctrica (EE) (*in vitro* como *in vivo*) induce la transición fenotípica de un músculo. De modo interesante, el EE de baja frecuencia induce marcadores de transición fenotípica rápido/lenta por una vía dependiente de la activación del IP₃R. Además, se ha establecido al uniportador de Ca²⁺ mitocondrial como un regulador del trofismo muscular. Hipotetizamos que la regulación de los niveles de RNAm del uniportador de Ca²⁺ mitocondrial y de sus proteínas reguladoras en respuesta a EE de baja frecuencia es dependiente de la activación del IP₃R. Fibras musculares adultas aisladas desde el músculo *flexor digitorum brevis* (fdb) de ratones C57BL/6J de 8 a 10 semanas de edad fueron expuestas a EE de baja frecuencia en presencia o ausencia de inhibidores de la vía propuesta. Se observó que el estímulo eléctrico de baja frecuencia resulta en una disminución de los niveles de RNAm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE, mientras que el EE de alta frecuencia no genera modificaciones. Las fibras musculares esqueléticas pre-incubadas con apirasa (enzima que degrada ATP) y xestospongina B (inhibidor de los receptores de IP₃) previenen la disminución de los niveles de RNAm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE mediada por un EE de baja frecuencia. El ATP extracelular exógeno (agregado al medio de incubación) resulta en una disminución de los niveles de RNAm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE). Además, este efecto de EE no es prevenido por actinomicina D (inhibidor de la transcripción). Este trabajo contribuye a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la plasticidad muscular en respuesta a ejercicio físico y en particular, al rol de la mitocondria en estos mecanismos.

Abstract

Muscular plasticity is the ability of the skeletal muscle cells of different external stimuli, modifying their phenotype. The frequency of electrical stimulation (ES) (*in vitro* as *in vivo*) induces the phenotypic transition of a muscle. Interestingly, low frequency ES induces rapid / slow phenotypic transition markers by a pathway dependent on the activation of IP₃R. In addition, the mitochondrial Ca²⁺ uniporter has been established as a regulator of muscle trophism. We hypothesized that the regulation of mRNA levels of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter and its regulatory proteins in response to low frequency EE is dependent on the activation of IP₃R. Adult muscle fibers isolated from the flexor digitorum brevis muscle (fdb) of C57BL / 6J mice from 8 to 10 weeks of age were exposed to low frequency ES in the presence or absence of inhibitors of the proposed pathway. It was observed that the low frequency electrical stimulus results in a decrease in mRNA levels of MCU, MICU1, MICU2 and EMRE, while high frequency ES does not generate modifications. Skeletal muscle fibers pre-incubated with apirasa (enzyme that degrades ATP) and xestospongine B (inhibitor of IP₃ receptors) prevent the decrease of mRNA levels of MCU, MICU1, MICU2 and EMRE mediated by a low frequency ES. Exogenous extracellular ATP (added to the incubation medium) results in a decrease in mRNA levels of MCU, MICU1, MICU2 and EMRE. In addition, this effect of ES is not prevented by actinomycin D (transcription inhibitor). This work contributes to the understanding of the molecular mechanisms involved in muscle plasticity in response to physical exercise and, in particular, to the role of mitochondria in these mechanisms.

Abreviaturas

EE = Estimulación eléctrica

RNA_m = RNA mensajero

MHCIIa = Isoforma IIa de la cadena pesada de miosina

SERCA = Bomba de Ca²⁺ del retículo sarcoplasmático

RyR1 = isoforma 1 del canal de Ca²⁺ receptor de rianodina

IP₃R = Receptor de inositol 1,4,5 – trifosfato

TnIs = Isoforma lenta de troponina I

TnIf = Isoforma rápida de troponina I

fdb = Flexor corto de los dedos

Ca_v1.1 = Canal de Ca²⁺ tipo L, isoforma expresada por el músculo esquelético

DHPR = Receptor de dihidropiridina (nombre alternativo para Cav1.1)

ATP = Adenosín trifosfato

Panx1 = Canales de Panexina tipo 1

PI3K = Fosfatidil inositol 3 kinasa

PLC = Fosfolipasa C

IP₃ = Inositol 1,4,5 trifosfato

SR = Retículo sarcoplasmático

ADP = Adenosina difosfato

AMP = Adenosina monofosfato

VDAC = Canal aniónico sensible a voltaje

MCU = Uniportador de Ca²⁺ mitocondrial

MICU1 = *Mitochondrial Calcium Uptake 1*

MICU2 = *Mitochondrial Calcium Uptake 2*

MCUb = *Mitochondrial Calcium Uniporter b*

MCUR = *MCU Regulator 1*

EMRE = *Essencial MCU Regulator*

RT = Retrotranscripción reversa

qPCR = Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real

Apy = Apirasa

XB = Xestospongina B

AcD = Actinomicina D

miRNA = MicroRNA

Introducción

Plasticidad muscular

La plasticidad muscular corresponde a la capacidad que tiene el músculo esquelético de adaptarse en respuesta a estímulos externos, por ejemplo desuso (1), hipoxia (2), ejercicio físico (3, 4), entre otros. (5). El ejercicio físico induce la activación de diversas vías de señalización, las que han sido vinculadas con cambios fenotípicos del tejido muscular, por ejemplo, cambios en la velocidad de contracción, resistencia a la fatiga, tipo de metabolismo (oxidativa/glucolítica) de la célula muscular, entre otras (5, 6). Estos cambios dependerán de diversos factores tales como modalidad de ejercicio físico, duración, frecuencia y/o intensidad del mismo (5). La utilización de modelos *in vitro* para el estudio de las adaptaciones musculares inducidas por ejercicio físico, han permitido la descripción parcial de los eventos moleculares asociados a la plasticidad muscular (7-9); por ejemplo, fibras musculares esqueléticas sometidas a estimulación eléctrica (EE) de baja frecuencia (20 Hz) – como modelo de ejercicio aeróbico – incrementan la expresión génica de la isoforma lenta de troponina I, un marcador característico de la transición fenotípica desde un músculo rápido hacia un músculo lento (10).

La contracción muscular, tanto *in vitro* como *in vivo*, genera incrementos transitorios en los niveles de RNA mensajero (RNAm) de numerosos genes (6), por ejemplo, tanto un ejercicio aeróbico *in vivo* como un EE de baja frecuencia *in vitro* aumentan los niveles de RNAm para interleuquina 6 (IL-6) en fibras de músculo esquelético adulto de ratón (8). Los cambios en los niveles de RNAm coinciden con las modificaciones en los niveles de proteínas (6). Es probable que la acumulación de proteínas producto de esos cambios agudos en la expresión génica sean la base de las adaptaciones crónicas que se producen con el entrenamiento físico (5, 6, 11, 12).

Plasticidad muscular y frecuencia de estimulación

El músculo esquelético está compuesto por diversos tipos de fibras musculares. De manera clásica, en base al tiempo necesario para generar tensión máxima y en los mecanismos para obtener ATP necesario para los ciclos de contracción, los que se asocian a la resistencia a la fatiga de fibras, las fibras musculares esqueléticas pueden agruparse en fibras musculares lentas tipo I o rojas (debido a su alto contenido de mioglobina) resistentes a la fatiga y rápidas tipo II o blancas, pudiendo ser resistentes a la fatiga o fatigables (13, 14). Además, una subclasificación de las fibras musculares tipo II son las fibras tipo IIa y IIx en humanos y en roedores se encuentran además las fibras musculares tipo IIb (las más rápidas y fatigables) (15).

Los primeros antecedentes de que la frecuencia de estimulación gatilla eventos moleculares asociados a plasticidad muscular se originaron en modelos *in vivo* de inervación cruzada, en donde se observó una transición fenotípica desde rápido a lento en músculos rápidos inervados con α -motoneuronas que presentan una baja frecuencia de estimulación (16, 17). Adicionalmente, la estimulación de músculo denervado con un patrón de estimulación de baja frecuencia (10 Hz) incrementa la expresión génica de marcadores musculares vinculados con la transición desde un fenotipo muscular rápido a un fenotipo muscular lento (10). Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la frecuencia de estimulación induce cambios en la expresión de genes involucrados en la plasticidad del músculo esquelético adulto, demostrando la participación de los IP₃R en la activación de genes de programas asociados a fenotipo lento que se activan a bajas frecuencias de estimulación (7).

Así, el EE de baja frecuencia constituye una herramienta adecuada para inducir la activación de diversas vías de señalización que llevan al desarrollo de un fenotipo

muscular lento, emulando parcialmente los cambios musculares inducidos por entrenamiento aeróbico (7, 18, 19).

Papel del Ca^{2+} en la plasticidad muscular

Se han descrito diversos mecanismos para explicar los cambios en la expresión génica en respuesta a ejercicio físico. Uno de ellos se apoya en los cambios transitorios en la concentración de calcio citoplasmático libre (Ca^{2+}) en fibra muscular esquelética durante la contracción muscular (6, 20). Los incrementos transitorios de Ca^{2+} en el citoplasma controlan diversos eventos celulares como el metabolismo mitocondrial (21), la síntesis de proteínas (7, 10) y la expresión génica (8). De modo interesante, la frecuencia, duración, amplitud y localización subcelular de los cambios en la concentración de Ca^{2+} determinarán el efecto final de este ión (22).

En músculo esquelético, numerosos genes son regulados por aumentos transitorios de Ca^{2+} (6, 15). Sin embargo, mientras algunos genes son inducidos, otros genes son reprimidos frente a aumentos en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Por ejemplo, la isoforma Ila de la cadena pesada de miosina (MHCIIa) (23, 24), el transportador de glucosa tipo 4 (Glut-4) (25), las proteínas mitocondriales citocromo C (24) y succinato deshidrogenasa son inducidas por aumentos de Ca^{2+} , mientras que la expresión génica de calsecuestrina y la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (SERCA) son reprimidos (26).

La despolarización de células de cultivo primario de músculo esquelético genera dos señales transitorias de Ca^{2+} , las cuales son independientes entre sí (27). La primera señal transitoria de Ca^{2+} es mediada por la isoforma 1 del canal de Ca^{2+} receptor de rianodina (RyR1) y es necesaria para el acoplamiento excitación-contracción (6, 27). La segunda señal transitoria de Ca^{2+} es mediada por el receptor de inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3R) y

participa en el acoplamiento excitación-transcripción (7, 11). Este fenómeno se observa también en fibras musculares adultas, donde el acoplamiento excitación-transcripción vincula la despolarización de fibras musculares con cambios en la expresión génica de las mismas (28, 29). En el caso de las isoformas lenta (TnIs) y rápida (TnIf) de troponina I, que presentan un patrón de expresión restringido a músculo lento y rápido respectivamente (10, 19), nuestro laboratorio demostró que la EE a baja frecuencia (20 Hz) produce un incremento de los RNAm de TnIs, disminuyendo aquellos de TnIf en músculo flexor corto de los dedos (*fdb*) de ratón, cambios que son prevenidos por xestopongina B, un inhibidor específico del IP₃R. Lo anterior sugiere el inicio del cambio fenotípico desde un músculo rápido a lento, por un mecanismo dependiente de IP₃R (19). Además, la EE a alta frecuencia (90 Hz) generó el efecto contrario, reduciendo los niveles de RNAm de TnIs e incrementando los de TnIf, fenómeno que fue independiente de la activación del IP₃R (19).

En conjunto, estos antecedentes demuestran que diferentes frecuencias de EE activan distintas vías de señalización, las que conducen a adaptaciones musculares específicas relacionadas con cambios en el fenotipo muscular. Algunas de estas vías de señalización son moduladas por señales transitorias de Ca²⁺ citosólico dependientes de IP₃R en fibras musculares.

Papel de IP₃R en la plasticidad muscular

El acoplamiento excitación-transcripción de la fibra muscular está relacionada con la señal citosólica lenta de Ca²⁺, mediada por la activación del IP₃R (27). Esta vía de señalización comienza con la detección de un cambio en el potencial de membrana por parte del canal de Ca²⁺ tipo L (Ca_v1.1) o receptor de dihidropiridina (DHPR) (30), la liberación de adenosina trifosfato (ATP), desde el interior de la fibra muscular hacia el medio extracelular, a través de los canales de Panexina tipo 1 (Panx1). El ATP extracelular y sus

metabolitos pueden así actuar en forma auto y paracrina, activando los receptores nucleotídicos acoplados a proteína G, los que activan a la proteína fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) y con ello la enzima fosfolipasa C (PLC) con la consecuente producción intracelular del segundo mensajero inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) (7, 30, 31).

Posteriormente, el IP₃ se une a su receptor en la membrana del retículo sarcoplasmático (SR) y en la envoltura nuclear, provocando la salida de Ca²⁺ desde el SR y el consecuente aumento en la concentración citosólica y nuclear de Ca²⁺, lo que finalmente modula factores de transcripción que modifican la transcripción de genes (32).

Existen evidencias de que tanto la liberación de ATP al medio extracelular como la activación del IP₃R, son necesarios para activar la vía de señalización involucrada en la transición fenotípica rápido/lento del músculo esquelético adulto en respuesta a EE de baja frecuencia (7). De modo interesante, tanto la liberación de ATP al medio extracelular así como la producción de IP₃ intracelular son dependientes de la frecuencia de estimulación, siendo máximas a una frecuencia de 20 Hz y menores en la medida que aumenta la frecuencia de estimulación, estando ausentes a frecuencias por sobre los 60 Hz (7).

Todos estos antecedentes sugieren que la activación de la vía de señalización mediada por ATP extracelular/IP₃/IP₃R es necesaria para activar algunos de los procesos de la transición fenotípica rápido/lento de una manera frecuencia-dependiente en músculo esquelético adulto.

Mitocondria y músculo esquelético

Durante la contracción muscular, los requerimientos energéticos de la fibra muscular se incrementan en varias veces comparados con el reposo (33). En las células musculares la mitocondria es la principal fuente de ATP. Las mitocondrias están delimitadas por dos

membranas: una membrana externa, permeable a pequeñas moléculas, y una membrana interna, mucho más selectiva al paso de solutos. De esta forma, las membranas delimitan dos espacios al interior de las mitocondrias: un espacio intermembrana, de composición similar al citosol, y una matriz mitocondrial, de composición muy selecta, que contiene entre otras moléculas, al DNA mitocondrial (34, 35).

La mitocondria juega un papel central en la función del musculo esquelético proporcionando ATP, el que es consumido principalmente por las proteínas SERCA y ATPasa de la cadena pesada de la miosina (36). Considerando que ambas enzimas aumentan su actividad durante la contracción muscular, el ingreso de Ca^{2+} a la mitocondria a través de MCU es clave para mantener el equilibrio entre los requerimientos y la síntesis de ATP en el músculo esquelético (37, 38).

En la mitocondria ocurren reacciones metabólicas claves. El acetil-CoA producido a partir de glucosa o ácidos grasos ingresa a la matriz mitocondrial y así puede participar en el ciclo de Krebs. La oxidación del acetil-CoA se utiliza para generar un poder reductor, en forma de NADH y FADH_2 . Posteriormente en la membrana mitocondrial interna, ambas moléculas transfieren sus electrones a los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones. La gradiente electroquímica de protones se genera como resultado de la transferencia de electrones (reacciones de óxido-reducción) y permite el funcionamiento de la ATPsintetasa. Los electrones que han transitado por la cadena respiratoria terminan en la molécula de oxígeno como aceptor final, formándose agua en el proceso. Finalmente, se forma una gradiente de protones hacia el interior de la matriz mitocondrial, cuya fuerza electromotriz permite la síntesis de ATP a partir de ADP (34, 39).

La función mitocondrial es estimulada por diversas moléculas, tales como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) y Ca^{2+} (40, 41). En la matriz mitocondrial existen diferentes enzimas que tiene como co-factor al Ca^{2+} , por ejemplo, las enzimas del

ciclo de Krebs isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa. En consecuencia, aumentos de la concentración intramitocondrial de Ca^{2+} incrementan la actividad de estas enzimas, aumentando la velocidad del ciclo de Krebs y con ello la producción de compuestos reducidos (NADH y FADH_2) que posteriormente alimentan la cadena transportadora de electrones y la síntesis de ATP (42). El ingreso de Ca^{2+} desde el citoplasma al espacio intermembrana está mediado por el canal aniónico sensible a voltaje (VDAC), luego el Ca^{2+} ingresa desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial por el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) (43). Así, los cambios transitorios en la concentración de Ca^{2+} generados durante la contracción muscular pueden ser suficientes para activar el ingreso de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, aumentando con ello la síntesis de ATP (44), manteniendo de esta forma el balance entre los requerimientos de ATP y la síntesis del mismo.

Uniportador de calcio mitocondrial (MCU) y función muscular

El MCU está ubicado en la membrana mitocondrial interna y presenta una alta selectividad por Ca^{2+} , realizando un transporte electrogénico del ión (45-47). El año 2011, caracterizaron molecularmente MCU (38, 48). MCU presenta dos dominios transmembrana – TM1 y TM2 – unidos por una asa corta de aminoácidos orientada hacia el espacio intermembrana, que contiene un motivo DIME requerido para su selectividad por Ca^{2+} , especialmente los residuos ácidos E257, D261 y E264 (38). Además, MCU está asociado a diferentes proteínas regulatorias que modulan su afinidad por Ca^{2+} (49, 50), MCU más sus proteínas reguladoras son conocidos en conjunto como *complejo MCU*, en donde MCU formaría el canal de Ca^{2+} en la membrana mitocondrial interna.

A la fecha se han descrito numerosas proteínas reguladoras de MCU, incluyendo a la familia MICU (*Mitochondrial Calcium Uptake 1*, la que incluye MICU 1, 2 y 3) (51), MCUB

(*Mitochondrial Calcium Uniporter b*) (52), MCUR (*MCU Regulator 1*) (53), EMRE (*Essencial MCU Regulator*) (54), entre otras.

Los principales componentes del complejo MCU expresados en músculo esquelético adulto son MCU, EMRE, MICU1 y MICU2 (55). Además, se describió en este tipo de tejido un *splicing* alternativo de MICU1, MICU1.1, caracterizado por un micro exón que codifica 4 aminoácidos y que modifica las propiedades del complejo MCU.

EMRE es una proteína transmembrana de 10 kDa localizada en la membrana mitocondrial interna que permitiría el ensamblaje del complejo MCU en célula de mamíferos (54, 56). En estudios electrofisiológicos, Vais y colaboradores (57) demostraron que EMRE regularía el ingreso de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, previniendo la sobrecarga de Ca^{2+} en este organelo.

La captación de Ca^{2+} por las mitocondrias exhibe una cinética sigmoidea (53). Esta cinética estaría determinada por proteínas que regularían la actividad de MCU, por ejemplo MICU1 y MICU2. MICU1 es una proteína soluble localizada en el espacio intermembrana que inhibe a MCU cuando la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma es baja ($\approx 100\text{nM}$) (58-60). Así, el silenciamiento de MICU1 en células endoteliales genera una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y reduce la eficiencia de captación de Ca^{2+} vía MCU (59). Por otro lado, MICU2 también se ubica en el espacio intermembrana y formaría un heterodímero obligado con MICU1, siendo este dímero el real responsable de evitar la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} en reposo (61). De manera interesante, la disminución de MICU1 reduce la estabilidad de MICU2, sugiriendo que la acumulación de Ca^{2+} en mitocondrias carentes de MICU1 estaría asociada a una reducción del dímero MICU1/2 (figura A) (61).

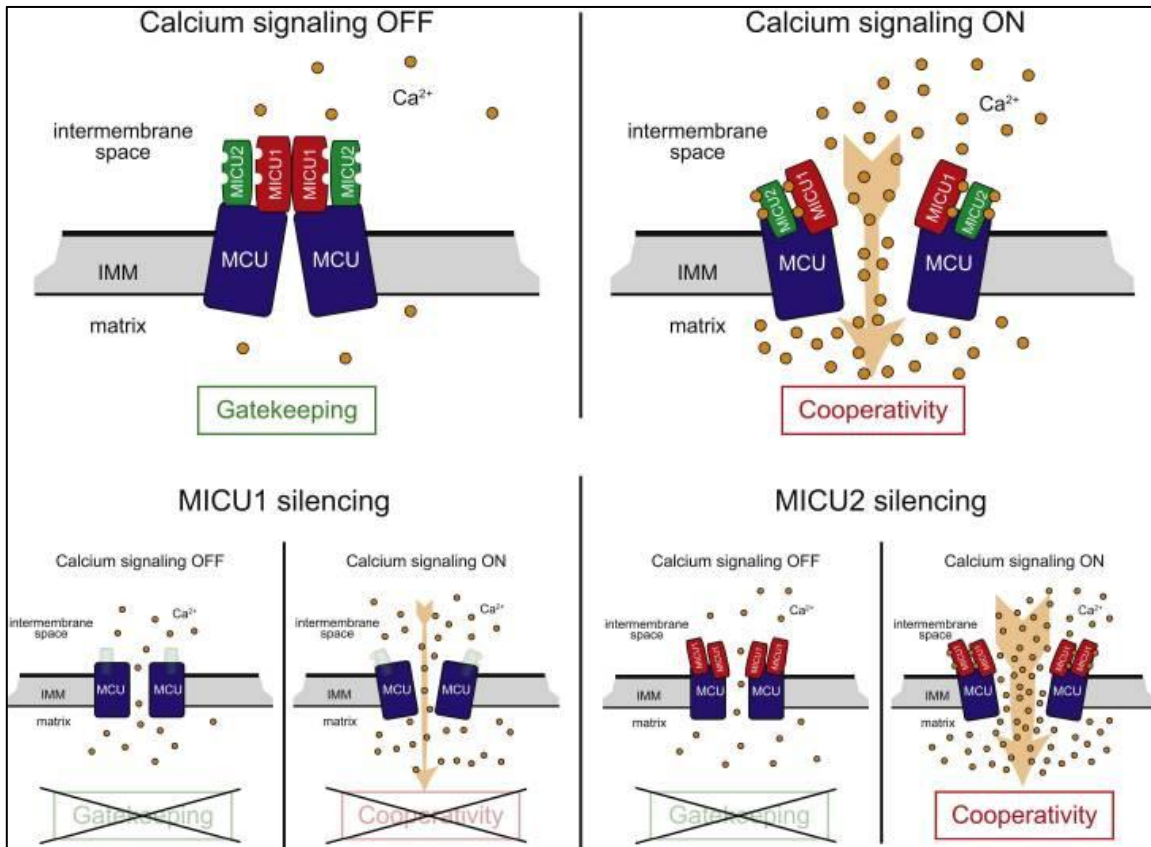


Figura A. Representación esquemática de la captación de Ca^{2+} mitocondrial mediada por el complejo MCU (61). En condiciones de reposo (arriba a la izquierda), los heterodímeros MICU1-MICU2 actúan como el controlador de MCU, gracias al efecto inhibitorio predominante de MICU2; los aumentos en la concentración de calcio (arriba a la derecha) inducen un cambio conformacional en todo el dímero que libera la inhibición de dependiente de MICU2 y desencadena una mejora mediada por MICU1 de la actividad de canalización de MCU. Además, la eliminación de MICU1 con la consiguiente desaparición de MICU2 (abajo a la izquierda) conduce a la pérdida tanto del control de acceso (*gatekeeping*) en reposo como a la cooperatividad (*cooperativity*) activada por la activación de la señalización de calcio. Por otro lado, la eliminación selectiva de MICU2 (parte inferior derecha) provoca la pérdida del mecanismo de control pero induce la formación del homodímero MICU1-MICU1 que mejora la absorción de calcio mitocondrial después de la estimulación celular. IMM, membrana mitocondrial interna.

A pesar de que la abundancia de los componentes del complejo MCU es relevante, la razón de expresión entre estas proteínas parece tener mayor significancia fisiológica. Por ejemplo, la razón MICU1/MCU afecta la captación mitocondrial de Ca^{2+} (62). Mientras que esta razón es elevada en tejidos como cerebro e hígado, el músculo esquelético presenta la menor relación MICU1/MCU (62), sugiriendo un control diferencial del contenido de Ca^{2+} mitocondrial en diferentes tejidos. A pesar de estos antecedentes, aún es

completamente desconocido si estos componentes del complejo MCU se modifican en respuesta a la activación muscular inducida por despolarización o si la regulación de su expresión depende de los transitorios de Ca^{2+} citosólicos.

En músculo esquelético adulto, la despolarización genera un incremento del Ca^{2+} mitocondrial, fenómeno que depende tanto de la activación del RyR1 así como del IP_3R (63). De modo interesante, el silenciamiento de MCU previene completamente el incremento de Ca^{2+} mitocondrial inducido por despolarización (64), sugiriendo que MCU es necesario para el incremento de Ca^{2+} mitocondrial en músculo esquelético adulto.

Además de su papel en la bioenergética celular, MCU ha sido sugerido como un regulador de la masa muscular (36). Así, mientras que el silenciamiento de MCU induce atrofia muscular, la sobre expresión del mismo genera hipertrofia muscular en modelos murinos (36). De modo interesante, 9 semanas de entrenamiento de fuerza o EE de alta frecuencia (60Hz) en humanos induce hipertrofia e incrementa los niveles de MCU en músculo esquelético (65).

Recientemente, en la línea celular de pollo DT40 knock-out para el IP_3R se ha descrito que la expresión génica de MCU es inducida por Ca^{2+} (49). En este trabajo, los autores utilizaron ionomicina (ionóforo que aumenta de forma generalizada la concentración de Ca^{2+} intracelular) para inducir la expresión génica de MCU (49). Considerando que los efectos que poseen los cambios transitorios de Ca^{2+} sobre la función celular están determinados por su frecuencia, duración, amplitud y localización subcelular, el incremento de Ca^{2+} por ionomicina podría generar resultados complejos de interpretar. Además, se ha descrito en un modelo de neuronas hipocampales y corticales que los aumentos de Ca^{2+} citosólico inducidos por activación del receptor de NMDA reducen los niveles de MCU (66). Bajo este contexto, el papel de las señales transitorias de Ca^{2+} citosólico (inducidas por un estímulo fisiológico) sobre la regulación de la expresión génica

de MCU, MICU1.1, MICU2 y EMRE en músculo esquelético adulto son completamente desconocidas.

Hipótesis

“La estimulación eléctrica de baja frecuencia regula la expresión génica del complejo MCU por un mecanismo dependiente de la activación del IP₃R en fibras musculares adultas de ratón”

Objetivo General

Determinar la participación del IP₃R sobre la regulación de la expresión génica del complejo MCU inducido por estímulo eléctrico de baja frecuencia en fibras musculares adultas de ratón.

Objetivo Específico

1. Determinar el efecto del estímulo eléctrico de baja frecuencia en los niveles de RNAm de MCU, MICU1.1, MICU2 y EMRE en fibras musculares esquelética adultas de ratón.
 - Justificación: Según nuestros resultados preliminares, el EE de 20Hz reduce los niveles de mRNA de MCU de manera breve y al ser un estímulo de poca duración (14 s), es poco probable que induzca cambios en la abundancia de la proteína MCU. Sin embargo, es un estímulo adecuado para medir cambios tempranos de la plasticidad muscular mediante los niveles de RNAm.

2. Determinar la participación del segundo mensajero IP_3 y su receptor IP_3R en los cambios de la expresión génica del complejo MCU en respuesta a EE de baja frecuencia (20Hz) en fibras musculares esqueléticas adultas de ratón.

- Justificación: La EE a baja frecuencia genera transitorios de Ca^{2+} citosólicos dependientes de IP_3/IP_3R . Se evaluará la participación tanto del segundo mensajero así como del receptor en los cambios del RNAm de MCU, MICU1.1, MICU2 y EMRE en respuesta a EE.

Observación. Considerando que nuestro resultado preliminar sugiere que el EE a baja frecuencia reduce los niveles de RNAm de MCU (Fig. 1) y que antecedentes previos han demostrado que a 20 Hz pero no a 90 Hz de estimulación se activa la vía de señalización IP_3/IP_3R (7), en este trabajo se utilizará una EE a 90 Hz como control negativo en todos los experimentos *in vitro*. Además, se evaluará con ello, la participación del canal de Ca^{2+} receptor de rianodina tipo 1 en los cambios de la expresión génica de MCU inducida por EE.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Se utilizaron ratones de la cepa C57/BL6J obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, los cuales serán mantenidos en una habitación con temperatura controlada en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas, según el protocolo de bioética CBA 0759FMUCH, asociado al proyecto FONDECYT N° 1151293.

Las fibras musculares adultas aisladas se obtuvieron del músculo flexor corto de los dedos (FDB) por digestión enzimática del músculo completo mediante 450-500 unidades/mL colagenasa por 90 min, seguida por disociación mecánica con pipetas

Pasteur de diferentes diámetros. El total de fibras aisladas se sembró en 4 cubre objetos (35 mm) cubiertos con ECM (sigma) en medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM, 10% suero de caballo y 1% penicilina/estreptomicina).

Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR)

Mediante RT-qPCR se analizaron los niveles de RNAm del complejo MCU en fibras en cultivo en condiciones basales, posterior a estimulación eléctrica de campo y en presencia o ausencia de diferentes inhibidores.

Se utilizó 18S como gen *housekeeping* para realizar el control interno de la cuantificación de cDNA y normalización de los productos amplificados. Los *primers* utilizados para el estudio de los niveles de RNAm de MCU, MICU1.1, MICU2 y EMRE son los siguientes:

MCU-fw: 5'-GTGCGCCTGTTTGTA ACTCA-3'

MCU-rv: 5'-CAAGACTCGCTAAGCCCTTT-3'

MICU1.1-fw: 5'-CTTTGATGGAAAGGAGTTCTGGC-3'

MICU1.1-rv: 5'-CCTCCATGTCTACCTCTCCGT-3'

MICU2-fw: 5'-TGGAGCACGACGGAGAGTAT-3'

MICU2-rv: 5'-GCCAGCTTCTTGACCAGTGT-3'

EMRE-fw: 5'-AACTTCGCTGCTCTGCTTGA-3'

EMRE-rv: 5'-TGAGGCTGAGGGCTTTCCTT -3'

Estimulación eléctrica de campo

Los protocolos de estimulación de las fibras celulares en cultivo han sido establecidos y utilizados previamente en nuestro laboratorio (7). Un estímulo a baja frecuencia (20Hz - 0,3 ms - 14 s) y otro de alta frecuencia (90Hz – 0,3 ms – 3 s).

Determinación del papel de la vía IP₃/IP₃R

Se incubaron las placas con los siguientes tratamientos antes de la estimulación eléctrica de campo. Se utilizó ATP extracelular exógeno como regulador río arriba de la producción de IP₃ y apirasa como inhibidor de esta acción. La participación del IP₃R se determinó usando xestospongina B (antagonista del IP₃R). Se determinó si el efecto observado es por control transcripcional utilizando Actinomicina D (inhibidor de la transcripción).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el programa GraphPad Prism7. Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar del promedio (\pm SEM). Por motivos del bajo número de muestra (n= 4 a 8) por experimento, se realizaron test estadísticos no paramétricos. Para la diferencia entre parejas de datos se utilizó el test U de Mann-Whitney o de Wilcoxon según corresponda, mientras que para comparar más de dos datos se utilizó el test de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn. En aquellos casos en los que se necesitó conocer la influencia de dos variables independientes sobre una dependiente, el test Two-way ANOVA con el post hoc de Bonferroni fue utilizado. El nivel de significancia fue establecido en $p < 0.05$.

Etapas del trabajo

Se establecieron dos fases de trabajo. Primero evaluar el efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de RNAm de MCU, MICU1.1, MICU2 y EMRE. Posterior a esto, se evaluó la participación del segundo mensajero IP₃ y IP₃R en el efecto observado.

Resultados

Niveles de RNAm del complejo MCU post estimulación eléctrica.

En un modelo de fibras aisladas se evaluó el efecto de la estimulación eléctrica en los niveles de RNAm del complejo MCU. Los niveles de RNAm de MCU presentan una disminución significativa a la media hora post-estimulación logrando su máxima caída a la hora post estimulación eléctrica de baja frecuencia (figura 1). Por el contrario, la estimulación eléctrica de alta frecuencia no produce cambios en los niveles de RNAm de MCU (figura 2). Además, se observó una disminución de los niveles de RNAm de MICU1, MICU2 y EMRE a la hora post EE de baja frecuencia, por el contrario, el EE de alta frecuencia no genera cambios en dichos genes (figura 3-5).

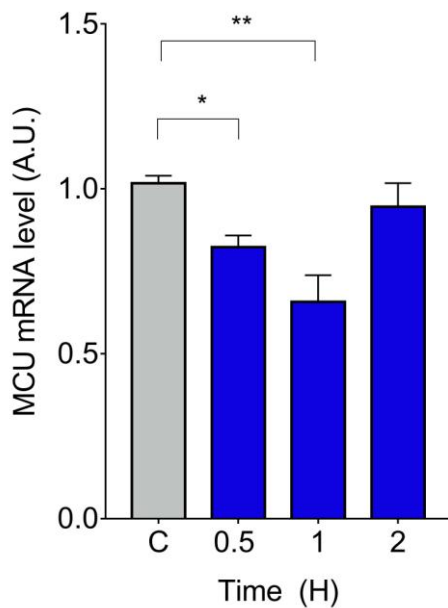


Figura 1. La estimulación eléctrica de baja frecuencia reduce transitoriamente los niveles de RNAm de MCU en fibras musculares esqueléticas. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb se estimularon eléctricamente (estimulación de campo de 20 Hz de duración de pulso de 0.3 ms durante 14 segundos). El RNAm se extrajo en diferentes momentos después de la estimulación. Los niveles de mRNA de MCU disminuyeron transitoriamente 1 hora después de EE. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. (n control = 8; n 0.5h = 6; n 1h = 8; n 2h = 5). 18s se usó como normalizador. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

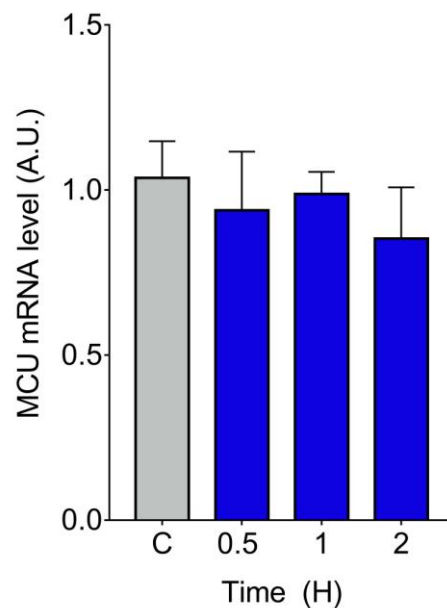


Figura 2. La estimulación eléctrica de alta frecuencia no afecta los niveles de RNAm de MCU en fibras musculares esqueléticas. Las fibras musculares se estimularon eléctricamente (estimulación de campo de 90 Hz de duración de pulso de 0,3 ms durante 3 segundos). El RNAm se extrajo en diferentes momentos después de la estimulación. No hay diferencia significativa en los niveles de mRNA de MCU después de EE. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. (n control = 7; n 0.5h = 5; n 1h = 6; n 2h = 5). 18s se usó como normalizador. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

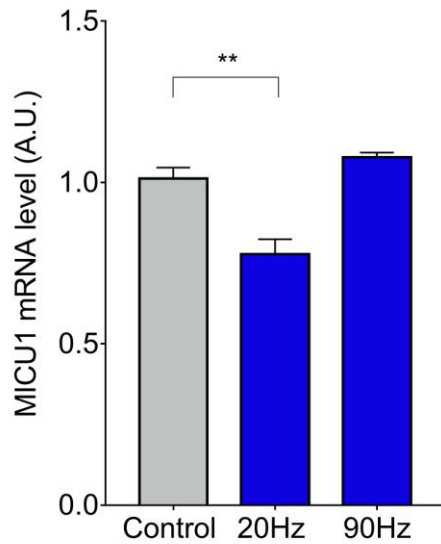


Figura 3. La estimulación eléctrica regula transitoriamente los niveles de RNAm de MICU1 en fibras musculares esqueléticas.

Las fibras musculares aisladas del músculo fdb se estimularon eléctricamente con un protocolo de baja frecuencia (estimulación de campo de 20 Hz de duración de pulso de 0.3 ms durante 14 segundos) y uno de alta frecuencia (estimulación de campo de 90 Hz de duración de pulso de 0.3 ms durante 3 segundos). El RNAm se extrajo en diferentes momentos después de la estimulación. Los niveles de mRNA de MICU1 disminuyeron transitoriamente 1 hora después del EE de baja frecuencia. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. (n control = 22; n 20Hz = 17; n 90Hz = 5). 18S se usó como normalizador. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

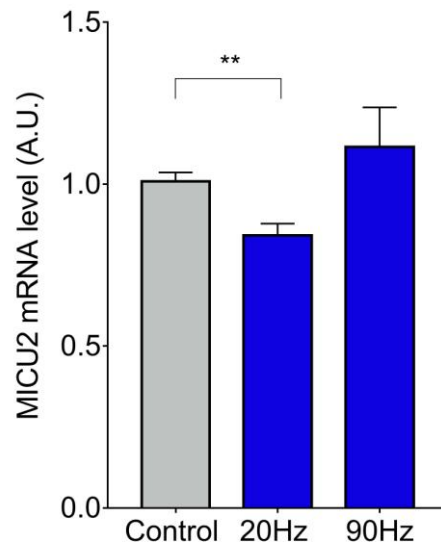


Figura 4. La estimulación eléctrica regula transitoriamente los niveles de RNAm de MICU2 en fibras musculares esqueléticas.

Las fibras musculares aisladas del músculo fdb se estimularon eléctricamente con un protocolo de baja frecuencia (estimulación de campo de 20 Hz de duración de pulso de 0.3 ms durante 14 segundos) y uno de alta frecuencia (estimulación de campo de 90 Hz de duración de pulso de 0.3 ms durante 3 segundos). El RNAm se extrajo en diferentes momentos después de la estimulación. Los niveles de mRNA de MICU2 disminuyeron transitoriamente 1 hora después de EE de baja frecuencia. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. (n control = 22; n 20Hz = 17; n 90Hz = 5). 18S se usó como normalizador. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

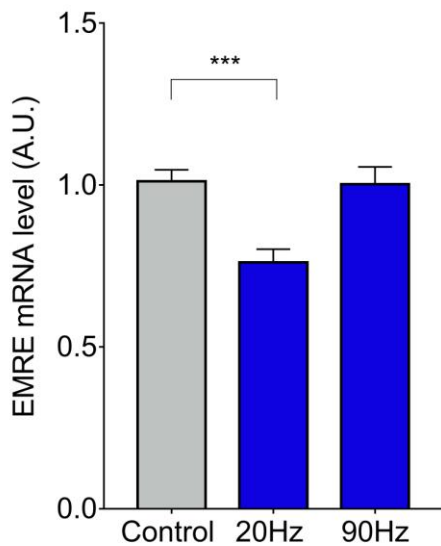


Figura 5. La estimulación eléctrica regula transitoriamente los niveles de RNAm de EMRE en fibras musculares esqueléticas. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb se estimularon eléctricamente con un protocolo de baja frecuencia (estimulación de campo de 20 Hz de duración de pulso de 0.3 ms durante 14 segundos) y uno de alta frecuencia (estimulación de campo de 90 Hz de duración de pulso de 0.3 ms durante 3 segundos). El RNAm se extrajo en diferentes momentos después de la estimulación. Los niveles de mRNA de EMRE disminuyeron transitoriamente 1 hora después de ES de baja frecuencia. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. (n control = 22; n 20Hz = 17; n 90Hz = 5). 18S se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

Participación del receptor IP₃R

Considerando que la liberación de Ca⁺² desde el receptor IP₃R depende de la salida de ATP al espacio extracelular. Se pre-incubaron fibras aisladas del FDB con 2U/ml de apirasa para producir una disminución en los niveles de ATP extracelular. Se observó un aumento significativo solo en los niveles de RNAm de MCU posterior a la incubación (figura 6). La disminución de RNAm observada en MCU, MICU1, MICU2 y EMRE mediante un EE de baja frecuencia fue prevenida al ser pre-incubada con apirasa (figura 6 - 9).

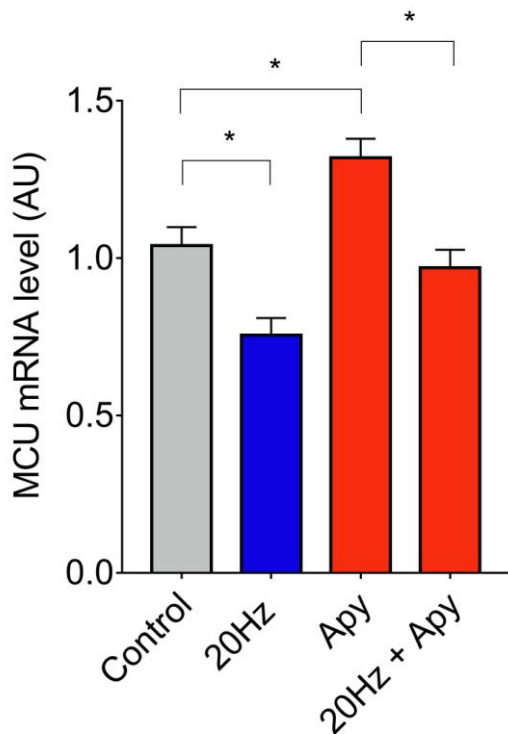


Figura 6. Fibras musculares esqueléticas pre incubadas con apirasa (Apy) aumenta los niveles de mRNA de MCU y previene la reducción transitoria después de la estimulación eléctrica de baja frecuencia. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb se preincubaron durante 30 minutos con apirasa (2U / ml) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de MCU aumentaron con la preincubación con apirasa en ausencia de estimulación eléctrica y se evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 22; n 20Hz = 17; n Apy = 6; n 20Hz+Apy= 6). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

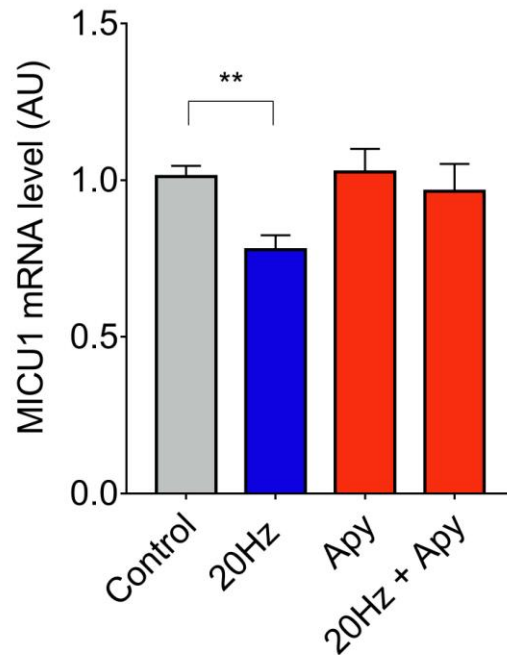


Figura 7. Fibras musculares esqueléticas pre incubadas con apirasa (Apy) previene la reducción transitoria después de la estimulación eléctrica de baja frecuencia. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb se preincubaron durante 30 minutos con apirasa (2U / ml) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. La preincubación con apirasa evitó la caída transitoria de los niveles de RNAm de MICU1 después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 22; n 20Hz = 17; n Apy = 6; n 20Hz+Apy= 6). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

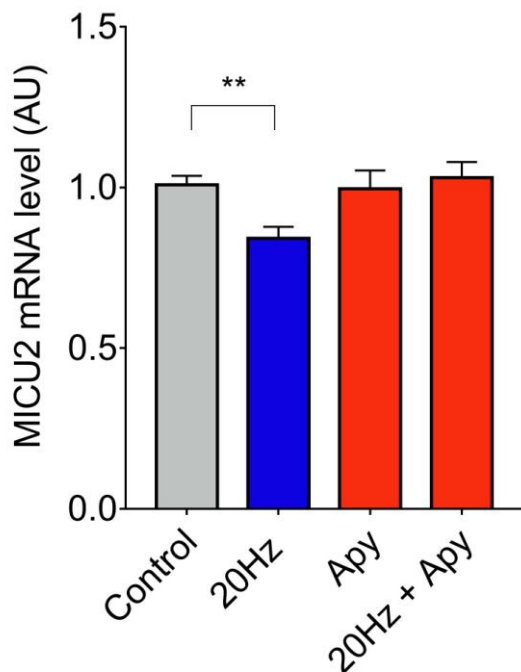


Figura 8. Fibras musculares esqueléticas pre incubadas con apirasa (Apy) previene la reducción transitoria después de la estimulación eléctrica de baja frecuencia. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb Brevis se preincubaron durante 30 minutos con apirasa (2U / ml) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. La preincubación con apirasa evitó la caída transitoria de los niveles de RNAm de MICU2 después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 22; n 20Hz = 17; n Apy = 6; n 20Hz+Apy= 6). 18s se usó como normalizador. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

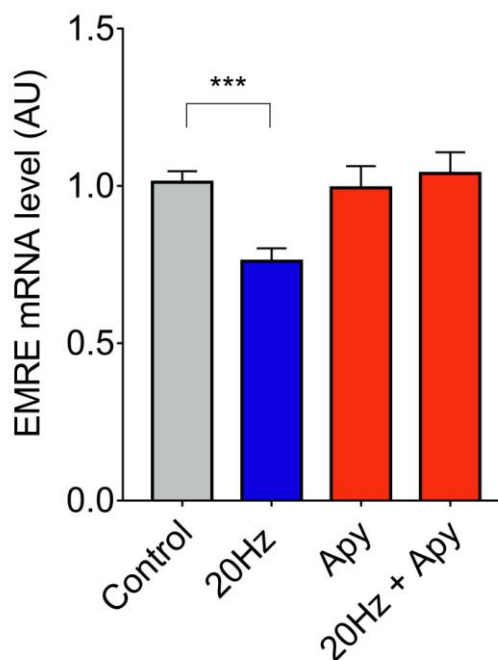


Figura 9. Fibras musculares esqueléticas pre incubadas con apirasa (Apy) previene la reducción transitoria después de la estimulación eléctrica de baja frecuencia. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb se preincubaron durante 30 minutos con apirasa (2U / ml) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. La preincubación con apirasa evitó la caída transitoria de los niveles de RNAm de EMRE después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 22; n 20Hz = 18; n Apy = 6; n 20Hz+Apy= 6). 18s se usó como normalizador. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

Se procedió luego a evaluar el efecto de 100 μM de ATP exógeno agregado al medio extracelular a diferentes tiempos sobre los niveles de RNAm de MCU. No se observaron cambios significativos a los 15 min, 30 min y 1h posterior a la administración de ATP (figura 10). Posterior a esto, se decidió realizar el mismo experimento con una concentración de 30 μM de ATP a diferentes tiempos, resultando a la media hora una disminución significativa de los niveles de RNAm de MCU (Figura 11). Por lo cual, se decidió evaluar MICU1, MICU2 y EMRE a la media hora con la misma dosis usada anteriormente observando una disminución significativa de los dichos genes (Figura 12-14).

La regulación río debajo de ATP y receptores purinérgicos puede ser mediada por la producción de IP_3 y Ca^{2+} liberado por el IP_3R , se decidió bloquear este canal de Ca^{2+} intracelular mediante el uso de Xestospongina B. No se observan cambios en los niveles de RNAm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE al ser incubadas con Xestospongina B en respuesta a un EE de baja frecuencia (Figura 15 - 18) lo que sugiere que esta vía está implicada en la regulación del complejo MCU.

Finalmente, se usó actinomicina D como inhibidor de la transcripción, para determinar si los cambios observados se relacionan con transcripción *de novo* o con alteraciones en la vida media de los RNAm observados. La incubación con la droga no produce cambios en los niveles de RNAm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE. Sin embargo, se observa una disminución de los niveles de RNAm de dichos genes cuando se pre incubaba en conjunto a un EE de baja frecuencia (Fig. 19-22). Lo que sugiere que dichos cambios ocurren en etapas posteriores a la transcripción, pudiendo actuar sobre la vida media de estos RNAm.

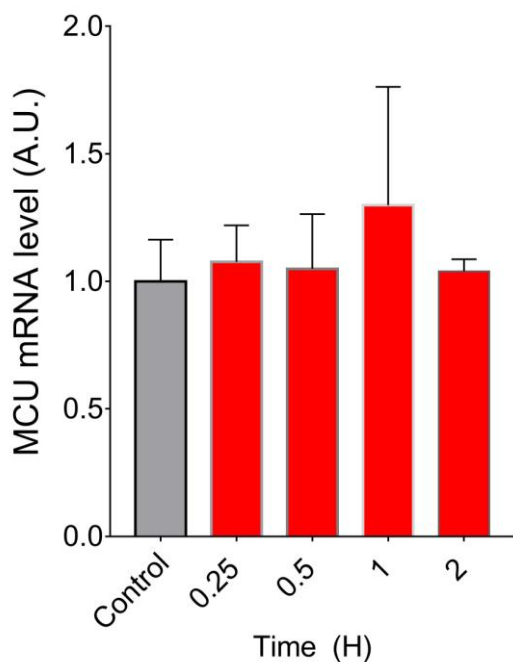


Figura 10. Incubación con 100 μ M de ATP extracelular no afecta los niveles de mRNA de MCU en fibras musculares esqueléticas.

Las fibras musculares se aislaron del músculo fdb estimulado con ATP extracelular (100 μ M). El RNAm se extrajo en diferentes momentos de su incubación. No se observaron cambios en los niveles de RNAm de MCU después de la preincubación con ATP extracelular. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. (n control = 7; n 0.25h = 3; n 0.5h = 4; n 1h = 4; n 2h = 4). 18s se usó como normalizador. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

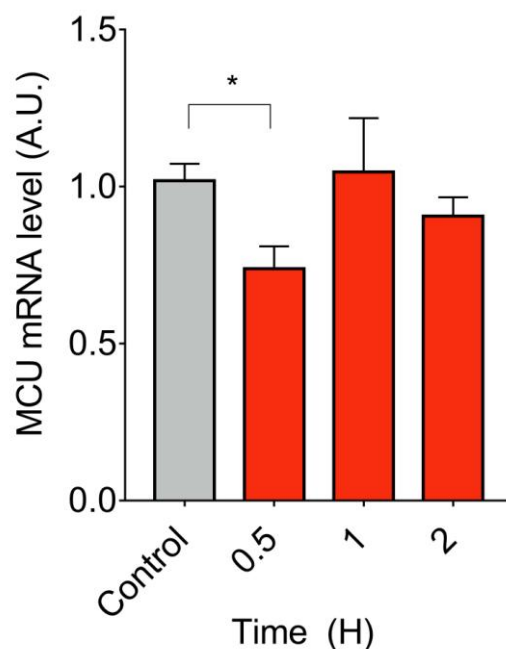


Figura 11. Incubación de 30 μ M de ATP extracelular reduce transitoriamente los niveles de mRNA de MCU en fibras musculares esqueléticas.

Las fibras musculares se aislaron del músculo fdb estimulado con ATP extracelular (30 μ M). El RNAm se extrajo en diferentes momentos de su incubación. No se observaron cambios en los niveles de RNAm de MCU después de la preincubación de ATP extracelular. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. (n control = 14; n 0.5h = 8; n 1h = 6; n 2h = 4). 18s se usó como normalizador. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

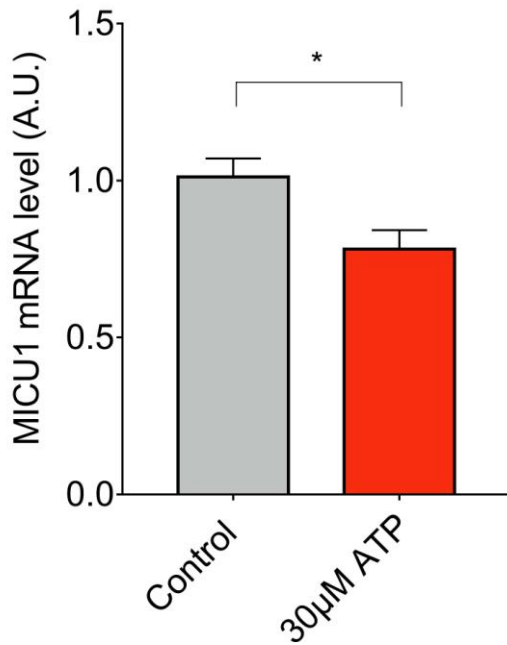


Figura 12. La estimulación con 30 µM de ATP extracelular reduce transitoriamente los niveles de mRNA de MICU1 en fibras musculares esqueléticas. Las fibras musculares se aislaron del músculo fdb estimulado con ATP extracelular (30 µM). El RNAm se extrajo a la media hora de su incubación. Se observó una disminución en los niveles de RNAm de MICU1 después de la preincubación con ATP extracelular. Los valores se presentan como media ± S.E.M. (n control = 8; n 30µM ATP = 8). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. U de Mann-Whitney test.

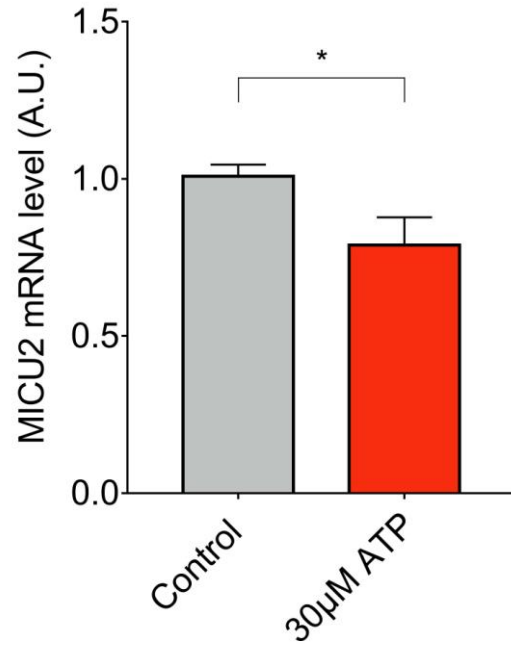


Figura 13. La estimulación con 30 µM de ATP extracelular reduce transitoriamente los niveles de mRNA de MICU2 en fibras musculares esqueléticas. Las fibras musculares se aislaron del músculo fdb estimulado con ATP extracelular (30 µM). El RNAm se extrajo a la media hora de su incubación. Se observó una disminución en los niveles de RNAm de MICU2 después de la preincubación con ATP extracelular. Los valores se presentan como media ± S.E.M. (n control = 15; n 30µM ATP = 8). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. U de Mann-Whitney test.

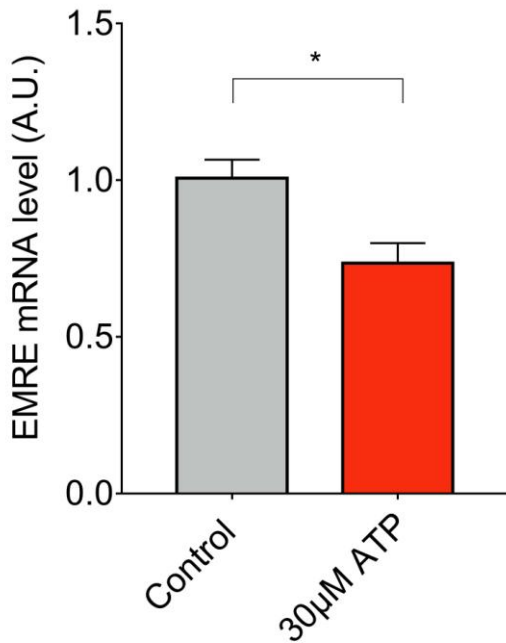


Figura 14. La estimulación con 30 µM de ATP extracelular reduce transitoriamente los niveles de mRNA de EMRE en fibras musculares esqueléticas. Las fibras musculares se aislaron del músculo fdb estimulado con ATP extracelular (30 µM). El RNAm se extrajo a la media hora de su incubación. Se observó una disminución en los niveles de RNAm de EMRE después de la preincubación con ATP extracelular. Los valores se presentan como media ± S.E.M. (n control = 5; n 30µM ATP = 5). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. U de Mann-Whitney test.

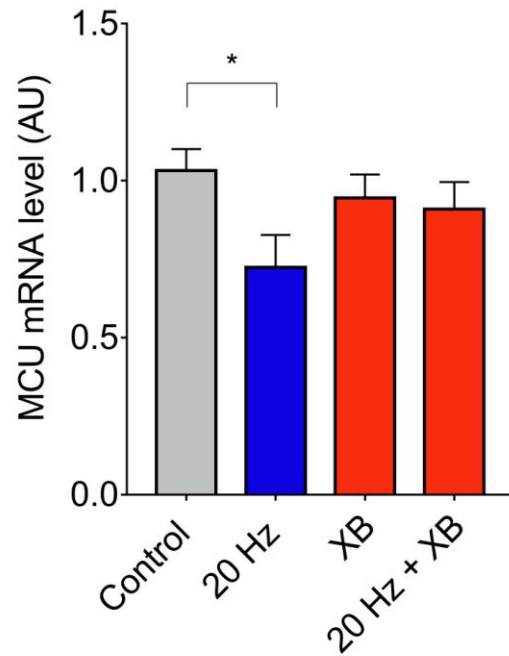


Figura 15. Fibras musculares esqueléticas pre tratadas con xestospongina B (XB) no produce cambios en los niveles de mRNA de MCU post estímulo eléctrico. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb pre tratadas con XB (10 µM) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de MCU no presentan cambios al ser pretratadas con XB y evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media ± S.E.M (n control = 8; n 20Hz = 4; n XB= 4; n 20Hz+XB= 5). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

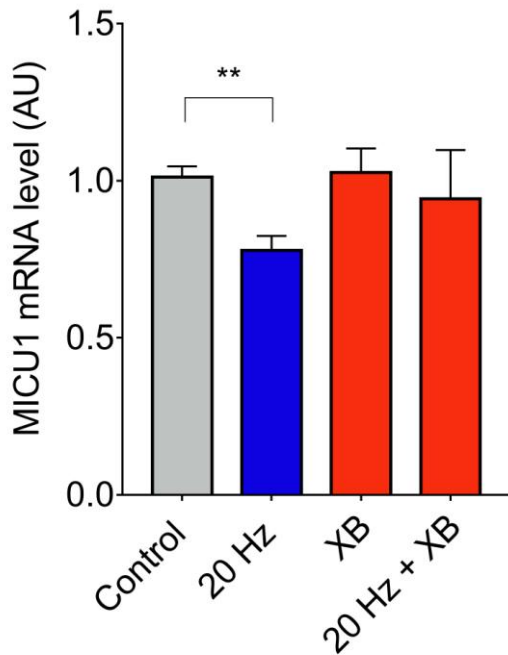


Figura 16. Fibras musculares esqueléticas pre tratadas con xestospongina B (XB) no produce cambios en los niveles de mRNA de MICU1 post estímulo eléctrico. Las fibras musculares aisladas del músculo Flexor Digitorium Brevis pre tratadas con XB (10 μ M) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de MICU1 no presentan cambios al ser pretratadas con XB y evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 22; n 20Hz = 17; n XB = 6; n 20Hz+XB = 6). 18s se usó como normalizador. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

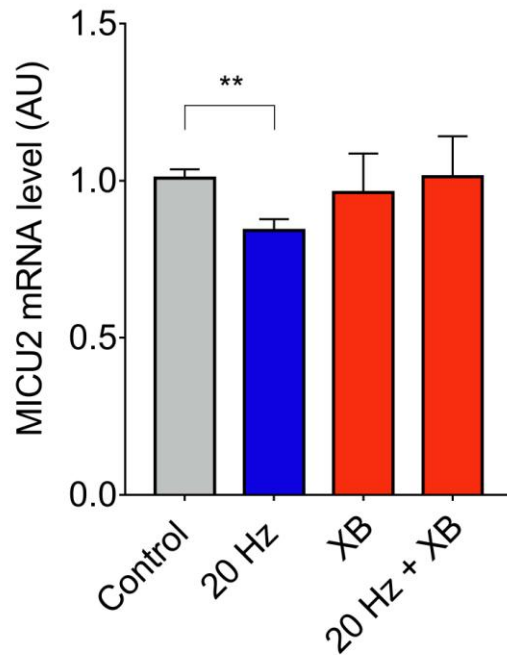


Figura 17. Fibras musculares esqueléticas pre tratadas con xestospongina B (XB) no produce cambios en los niveles de mRNA de MICU2 post estímulo eléctrico. Las fibras musculares aisladas del músculo Flexor Digitorium Brevis pre tratadas con XB (10 μ M) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de MICU2 no presentan cambios al ser pretratadas con XB y evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 22; n 20Hz = 17; n XB = 6; n 20Hz+XB = 6). 18s se usó como normalizador. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

Discusión

Según los datos, se observa que el estímulo eléctrico de baja frecuencia resulta en una disminución de los niveles de RNAm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE, mientras que el EE de alta frecuencia no genera modificaciones. Nuestro laboratorio ha descrito genes que son regulados de manera frecuencia dependiente, para genes relacionados con la

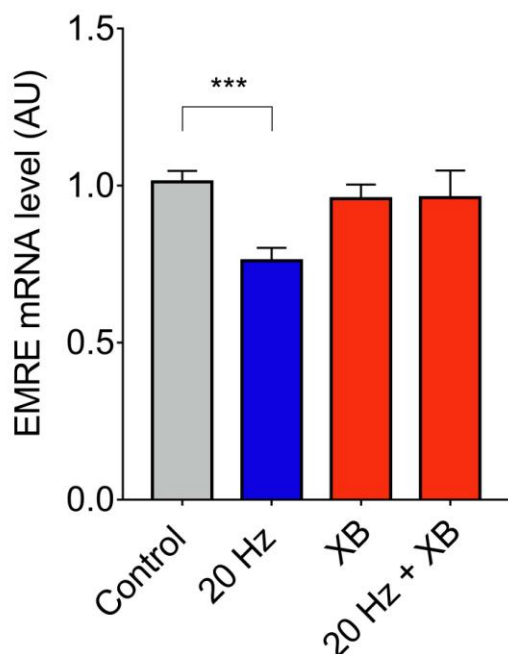


Figura 18. Fibras musculares esqueléticas pre tratadas con xestospongina B (XB) no produce cambios en los niveles de mRNA de EMRE post estímulo eléctrico. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb pre tratadas con XB (10 μ M) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de EMRE no presentan cambios al ser pretratadas con XB y evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 22;n 20Hz = 18;n XB= 6;n 20Hz+XB= 6).18s se usó como normalizador, **, p <0,05. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

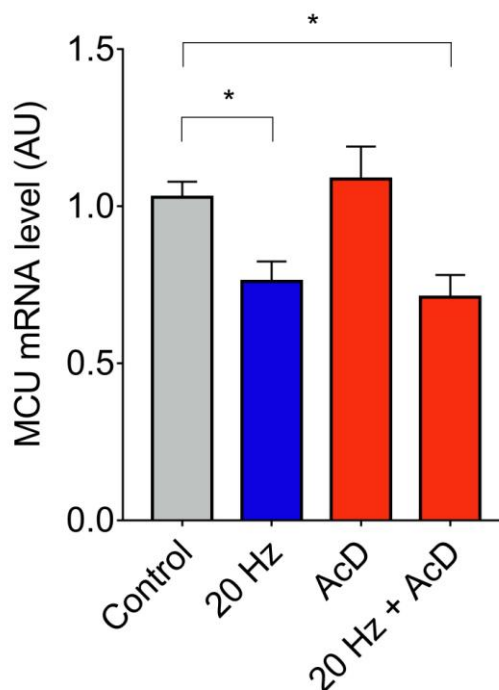


Figura 19. Fibras musculares esqueléticas pre tratadas con Actinomicina D (AcD) produce cambios en los niveles de mRNA de MCU post estímulo eléctrico. Las fibras musculares aisladas del músculo fdb se preincubaron durante 30 minutos con AcD (1,5 μ M) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de MCU no presentan cambios al ser pretratadas con AcD y no evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 23;n 20Hz = 8;n AcD= 7;n 20Hz+AcD= 7). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

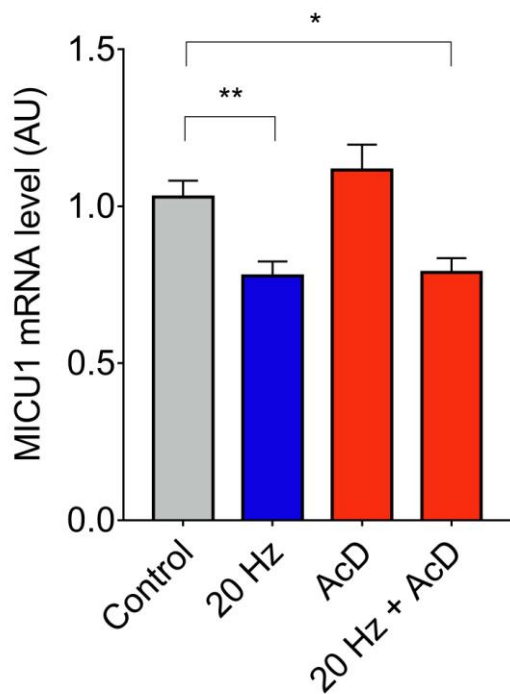


Figura 20. Fibras musculares esqueléticas pre tratadas con Actinomicina D (AcD) produce cambios en los niveles de mRNA de MICU1 post estímulo eléctrico. Las fibras musculares aisladas del músculo Flexor Digitorum Brevis se preincubaron durante 30 minutos con AcD (1,5 μ M) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de MICU1 no presentan cambios al ser pretratadas con AcD y no evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 23; n 20Hz = 8; n AcD= 7; n 20Hz+AcD= 7). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

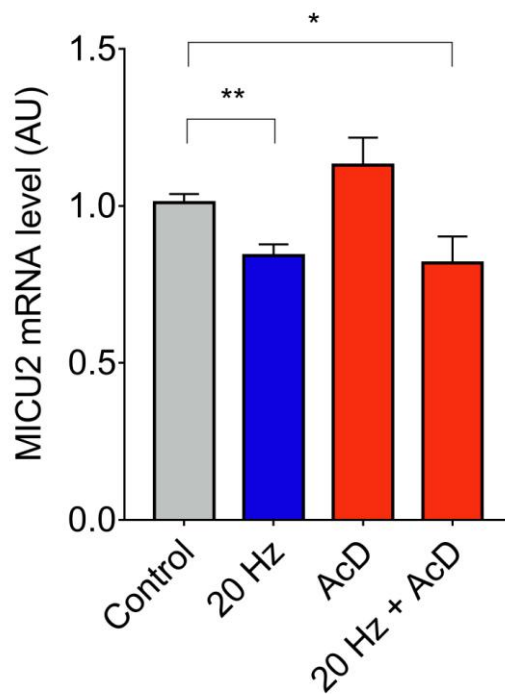


Figura 21. Fibras musculares esqueléticas pre tratadas con Actinomicina D (AcD) produce cambios en los niveles de mRNA de MICU2 post estímulo eléctrico. Las fibras musculares aisladas del músculo Flexor Digitorum Brevis se preincubaron durante 30 minutos con AcD (1,5 μ M) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de MICU2 no presentan cambios al ser pretratadas con AcD y no evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 23; n 20Hz = 8; n AcD= 7; n 20Hz+AcD= 7). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

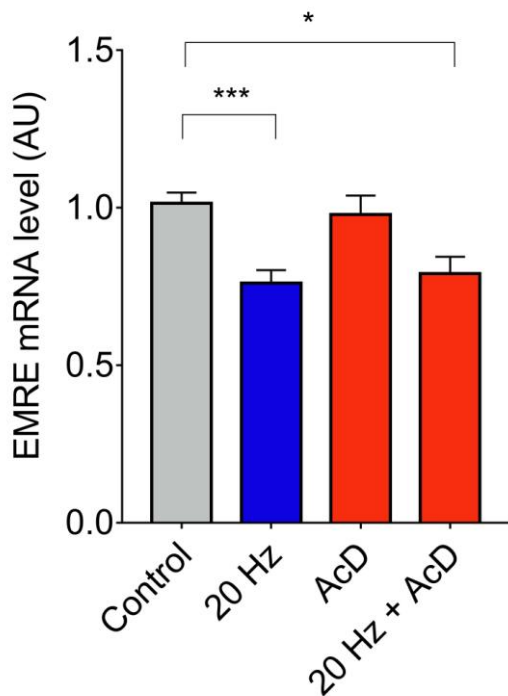


Figura 22. Fibras musculares esqueléticas pre tratadas con Actinomicina D (AcD) produce cambios en los niveles de mRNA de EMRE post estímulo eléctrico. Las fibras musculares aisladas del músculo Flexor Digitorum Brevis se preincubaron durante 30 minutos con AcD (1,5 μ M) antes de ser estimuladas eléctricamente (lo mismo que en la Figura 1). El RNAm se extrajo una hora después de la estimulación eléctrica. Los niveles de RNAm de EMRE no presentan cambios al ser pretratadas con AcD y no evitó su disminución transitoria después de la estimulación eléctrica. Los valores se presentan como media \pm S.E.M (n control = 23; n 20Hz = 8; n AcD= 7; n 20Hz+AcD= 7). 18s se usó como normalizador. *, p <0,05; **, p < 0,01; ***, p <0,001. Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn.

plasticidad del músculo adulto. Por lo tanto, MCU, MICU1, MICU2 y EMRE podría ser regulado de manera frecuencia dependiente, afectándose sólo frente a un EE de baja frecuencia. Esta disminución transitoria y de corta duración puede estar relacionada con una preparación de la mitocondria para la transición fenotípica de un músculo rápido a lento.

Las fibras musculares esqueléticas al ser pre-incubadas con apirasa (enzima que degrada ATP) muestran un aumento de los niveles de RNAm solo de MCU de forma basal, sugiriendo que el ATP presente en el medio extracelular de fibras en estado basal estaría ejerciendo una inhibición o des-represión sobre la transcripción de este gen. Además, al evaluar el efecto de un EE de baja frecuencia en presencia de apirasa, no se observa cambios en los niveles de RNAm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE comparado con su control. Estos resultados, concuerdan con la idea de que los efectos transcripcionales observados sobre MCU, MICU1, MICU2 y EMRE luego del EE de baja frecuencia dependen del ATP liberado a esta frecuencia por parte de las fibras musculares

estimuladas (7, 31). Sin embargo, cuando se compara 20 Hz en conjunto con apirasa sobre los niveles de RNAm de MCU con el grupo apirasa basal, no se observa la misma represión. Este resultado sugiere una represión en reposo mediada por el ATP extracelular basal en los niveles de RNAm de MCU y no de MICU1, MICU2 y EMRE.

Para evaluar el rol del ATP en los efectos observados en fibras bajo EE, se decidió estimular con ATP extracelular exógeno a diferentes concentraciones y tiempos emulando la liberación de ATP producida por el EE de baja frecuencia (7). La disminución de los niveles de RNAm del complejo MCU estimulado con 30 μ M de ATP extracelular exógeno a la media hora concuerda con lo observado con apirasa. De modo interesante, el efecto observado sería regulado de manera dosis-dependiente, debido que no hubo cambios usando 100 μ M de ATP extracelular. Se ha descrito que los diferentes receptores purinérgicos presentan diversos grados de afinidad por ATP gatillando diferentes vías de señalización (67). Además, 30 μ M de ATP extracelular reduciría el tiempo necesario para la disminución de los niveles de RNAm del complejo MCU; este fenómeno podría estar relacionado con la concentración final de ATP en los túbulos-T y su afinidad por los receptores purinérgicos (67), o la activación de estos receptores sin la liberación de ATP a través de los canales de panexina gatillado por la activación del DHPR. En primer lugar, el ATP administrado en el medio extracelular difunde hacia los túbulos-T para activar a los receptores purinérgicos. Sin embargo, la concentración alcanzada en este dominio no se ha descrito. Por tanto, se desconoce si la concentración de ATP alcanzada en el túbulo-T es similar entre un estímulo de 30 μ M de ATP extracelular exógeno y el logrado por un EE a baja frecuencia. Por consiguiente, se podría sugerir que la afinidad lograda por 30 μ M de ATP extracelular exógeno en los receptores P2Y podría favorecer la vía de señalización en los túbulo-T. En segundo lugar, se ha descrito un cierto tiempo de retardo entre EE de baja frecuencia y los aumentos de ATP extracelular (7). Por tanto, la

aplicación de ATP de manera exógena puede implicar un salto de algunas etapas previas a la activación de los receptores purinérgicos y así podemos observar un menor tiempo para la caída de los genes en comparación a un EE de baja frecuencia.

Los transitorios lentos de calcio son mediados por la activación del IP₃R, el cual está regulado río arriba por la liberación de ATP al espacio extracelular (11, 30). Por tal motivo, en fibras musculares esqueléticas al ser pre-incubadas con Xestospongina B (bloqueador del IP₃R) junto a un EE de baja frecuencia se previno la caída de los niveles de RNAm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE. Esto nos sugiere que la disminución de los niveles de RNAm del complejo MCU sería mediado por transitorios lentos de calcio activados por la vía de señalización ATP extracelular / IP₃ / IP₃R.

Se han descrito dos vías de regulación de MCU. La primera mediada por un factor de transcripción CREB, cuya fosforilación gatilla un aumento del RNAm y proteico en un modelo de linfocitos B (49, 68). La segunda, es una regulación mediada por microRNA (miRNA). Esta última, se caracteriza por ser secuencias cortas y no codificables, y regulan la expresión génica por unión complementaria en la región no traducible 3' (3'-UTR) del RNAm, lo que conlleva una degradación del RNAm objetivo o la inhibición de su traducción (68, 69). La biogénesis o procesamiento de los miRNA comienza con un transcrito primario (pri-miRNA) de genes que no codifican proteínas o de regiones intrónicas de un gen codificable, esta estructura es reconocida por un complejo de microprocesamiento que contiene la proteína unida a RNA DGCR8 y RNasa III Drosha. Este complejo corta el pri-miRNA y genera un pre-miRNA que es reconocida por la exportina 5' y Ran GTPasa llevándola hacia el citoplasma. En este lugar, interactúa con la RNasa III Dicer que corta el pre-miRNA resultando en su forma madura de miRNA (70, 71). Existen datos que muestran que la sobreexpresión de miR-25 en un modelo de cáncer de colon resulta en una disminución de los niveles de RNAm y proteína de MCU

asociándolo a una protección de las células tumorales (68, 72). Otro estudio, plantea una regulación de MCU mediada por miR-25 y miR-138 en un modelo de hipertensión arterial pulmonar en donde se observó células de musculatura lisa pulmonar (68, 73) Por tanto, la disminución que se observa del complejo MCU mediada por EE de baja frecuencia en presencia del bloqueador de la transcripción, actinomicina D, nos sugiere una posible regulación mediada por miRNA.

Finalmente, estos datos abren una serie de preguntas sobre los efectos de una disminución del complejo MCU en la plasticidad y metabolismo del músculo esquelético. En primer lugar, ¿Podría la disminución del complejo MCU ser un factor protector de la fibra muscular? Se ha descrito que la estimulación de neuronas corticales y del hipocampo resulta en una disminución del RNAm y proteína de MCU, que se asocian a un efecto protector evitando la sobrecarga de calcio mitocondrial, para así evitar la salida del citocromo C que gatilla la muerte celular (66). Asimismo, se ha observado que la disminución de MCU en un modelo de células provenientes del cáncer de colon resulta en una resistencia a la apoptosis (68, 72). Además, la concentración de Ca^{2+} mitocondrial necesario para sobrepasar el umbral y gatillar la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) en una fibra lenta es menor en comparación a una fibra rápida (74, 75). Por lo tanto, dado que la contracción muscular de una fibra de fenotipo lento resulta en elevaciones regulares y prolongadas en el tiempo producto de la contracción, se podría sugerir que una disminución del complejo MCU podría regular la entrada de calcio mitocondrial previniendo la apertura del mPTP y así proteger la fibra muscular.

En segundo lugar, ¿Por qué la transición fenotípica de un músculo rápido a lento resulta en una disminución del complejo MCU? Se sabe que la fibra muscular lenta tiene un mayor poder oxidativo que la rápida y por lo tanto necesita una mayor entrada de calcio

mitocondrial para la producción de ATP (6). Entonces, si disminuye el complejo MCU, ¿No tendría que disminuir también la entrada de calcio? Se podría especular que la entrada de calcio se mantendría estable, ya que la relación MICU1/MCU no cambiaría por la disminución del RNAm de ambos genes. Además, la transición fenotípica de músculo rápido a lento tendría que gatillar una disminución de la parvalbúmina (buffer de Ca^{2+} citoplasmático) debido que es restringido a músculo rápido (76). Por lo tanto, se podría inferir una regulación diferencial en la captación del Ca^{2+} mitocondrial en este modelo de plasticidad muscular. Otra posibilidad es que la disminución de la entrada de calcio podría ser compensada por un aumento de la sensibilidad del calcio por las enzimas isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa para mantener la producción de ATP según los requerimientos energéticos (77, 78). Además, se ha descrito una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en fibras rápidas asociadas a un incremento en la captación Ca^{2+} mitocondrial. Por tanto, una disminución en la concentración de calcio mitocondrial en una fibra lenta, podría estar relacionado con una menor producción de ROS, evitando la disfunción mitocondrial (75, 79). De modo interesante, la disminución de MCU mediante un shMCU, resultó en una disminución del área de sección transversal del tibial anterior y sóleo, además de una disminución de los marcadores de hipertrofia muscular (36). También, existen antecedentes de que entrenamientos de resistencia de larga duración en humanos, resulta en una atenuación de los marcadores de hipertrofia y una disminución de la masa muscular (80, 81). Se podría especular que un EE de baja frecuencia produciría adaptaciones musculares de un fenotipo rápido a lento que consideraría una regulación más fina del calcio mitocondrial y posibles adaptaciones mitocondriales que pudieran sostener un metabolismo oxidativo de una fibra lenta para suplir la demanda energética y una disminución de la masa muscular mediada por la disminución del complejo MCU.

En tercer lugar, ¿Podría estos cambios transitorios de RNAm resultar en modificaciones proteicas? Los cambios observados en los niveles de RNAm del complejo MCU son pequeños y de corta duración, por lo tanto es poco probable ver cambios en sus proteínas. Esto es debido probablemente al hecho de que el estímulo dado es también de corta duración, pero suficiente para evidenciar cambios transcripcionales. Por lo mismo, es de esperar que estímulos repetidos durante el tiempo pudieran gatillar cambios en la proteína y así ver cambios funcionales en la mitocondria, y por consecuencia, en la fibra muscular esquelética. Por ello, se requieren futuras investigaciones que evalúen los cambios en la proteína mediado por EE y las consecuencias de una caída del complejo MCU en las diferentes funciones de la fibra muscular esquelética.

Conclusión

El estímulo eléctrico de baja frecuencia disminuye los niveles de RNAm del complejo MCU (MCU, MICU1, MICU2 y EMRE).

La disminución del RNAm del complejo MCU es dependiente de la vía ATP extracelular/IP₃/IP₃R. Además, el ATP extracelular basal tiene un efecto represor del gen MCU.

La disminución de los niveles de RNAm del complejo MCU sugiere una regulación post-transcripcional.

La disminución del complejo MCU podría estar asociado a una adaptación mitocondrial de una transición fenotípica de un músculo rápido a lento.

Referencias

1. Goldspink DF, Morton AJ, Loughna P, Goldspink G. The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1986;407(3):333-40. Epub 1986/09/01.
2. Baresic M, Salatino S, Kupr B, van Nimwegen E, Handschin C. Transcriptional network analysis in muscle reveals AP-1 as a partner of PGC-1alpha in the regulation of the hypoxic gene program. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(16):2996-3012. Epub 2014/06/11.
3. Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exercise and sport sciences reviews*. 2012;40(3):159-64. Epub 2012/06/27.
4. Joseph AM, Adihetty PJ, Leeuwenburgh C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2016;594(18):5105-23. Epub 2015/10/28.
5. Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2011;86(3):564-600. Epub 2010/11/03.
6. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell metabolism*. 2013;17(2):162-84. Epub 2013/02/12.
7. Jorquera G, Altamirano F, Contreras-Ferrat A, Almarza G, Buvinic S, Jacquemond V, et al. Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 5):1189-98. Epub 2013/01/17.
8. Bustamante M, Fernandez-Verdejo R, Jaimovich E, Buvinic S. Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014;306(8):E869-82. Epub 2014/02/13.

9. Altamirano F, Valladares D, Henriquez-Olguin C, Casas M, Lopez JR, Allen PD, et al. Nifedipine treatment reduces resting calcium concentration, oxidative and apoptotic gene expression, and improves muscle function in dystrophic mdx mice. *PloS one*. 2013;8(12):e81222. Epub 2013/12/19.
10. Calvo S, Stauffer J, Nakayama M, Buonanno A. Transcriptional control of muscle plasticity: differential regulation of troponin I genes by electrical activity. *Developmental genetics*. 1996;19(2):169-81. Epub 1996/01/01.
11. Casas M, Buvinic S, Jaimovich E. ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exercise and sport sciences reviews*. 2014;42(3):110-6. Epub 2014/06/21.
12. Mounier R, Theret M, Lantier L, Foretz M, Viollet B. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2015;26(6):275-86. Epub 2015/03/31.
13. Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *The Journal of general physiology*. 1967;50(6):Suppl:197-218. Epub 1967/07/01.
14. Oe M, Nakajima I, Muroya S, Shibata M, Chikuni K. Relationships between tropomyosin and myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*. 2009;80(2):193-7. Epub 2010/02/19.
15. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*. 2011;91(4):1447-531. Epub 2011/10/21.
16. Eccles JC, Eccles RM, Kozak W. Further investigations on the influence of motoneurons on the speed of muscle contraction. *The Journal of physiology*. 1962;163(2):324-39. Epub 1962/09/01.

17. Salmons S, Vrbova G. The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *The Journal of physiology*. 1969;201(3):535-49. Epub 1969/05/01.
18. Klitgaard H, Mantoni M, Schiaffino S, Ausoni S, Gorza L, Laurent-Winter C, et al. Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men with different training backgrounds. *Acta physiologica Scandinavica*. 1990;140(1):41-54. Epub 1990/09/01.
19. Casas M, Figueroa R, Jorquera G, Escobar M, Molgo J, Jaimovich E. IP(3)-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *The Journal of general physiology*. 2010;136(4):455-67. Epub 2010/09/15.
20. Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:269-78. Epub 2007/08/19.
21. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002;418(6899):797-801. Epub 2002/08/16.
22. Berridge MJ. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochemical Society transactions*. 2012;40(2):297-309. Epub 2012/03/23.
23. Kubis HP, Haller EA, Wetzel P, Gros G. Adult fast myosin pattern and Ca²⁺-induced slow myosin pattern in primary skeletal muscle culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(8):4205-10. Epub 1997/04/15.
24. Akimoto T, Ribar TJ, Williams RS, Yan Z. Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(5):C1311-9. Epub 2004/07/02.

25. Ojuka EO, Goyaram V, Smith JA. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012;303(3):E322-31. Epub 2012/04/13.
26. Manttari S, Ortenblad N, Madsen K, Pilegaard H. Both short intense and prolonged moderate in vitro stimulation reduce the mRNA expression of calcium-regulatory proteins in rat skeletal muscle. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;373(1-2):171-8. Epub 2012/11/01.
27. Jaimovich E, Reyes R, Liberona JL, Powell JA. IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca(2+) signals in cultured skeletal muscle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;278(5):C998-C1010. Epub 2000/05/04.
28. Arias-Calderon M, Almarza G, Diaz-Vegas A, Contreras-Ferrat A, Valladares D, Casas M, et al. Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle. *Skeletal muscle*. 2016;6:15. Epub 2016/04/14.
29. Eltit JM, Garcia AA, Hidalgo J, Liberona JL, Chiong M, Lavandero S, et al. Membrane electrical activity elicits inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent slow Ca²⁺ signals through a Gbetagamma/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway in skeletal myotubes. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(17):12143-54. Epub 2006/03/04.
30. Araya R, Liberona JL, Cardenas JC, Riveros N, Estrada M, Powell JA, et al. Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *The Journal of general physiology*. 2003;121(1):3-16. Epub 2003/01/01.
31. Buvinic S, Almarza G, Bustamante M, Casas M, Lopez J, Riquelme M, et al. ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(50):34490-505. Epub 2009/10/14.

32. Carrasco MA, Riveros N, Rios J, Muller M, Torres F, Pineda J, et al. Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2003;284(6):C1438-47. Epub 2003/01/17.
33. Weibel ER, Hoppeler H. Exercise-induced maximal metabolic rate scales with muscle aerobic capacity. *The Journal of experimental biology*. 2005;208(Pt 9):1635-44. Epub 2005/04/28.
34. Madeira VM. Overview of mitochondrial bioenergetics. *Methods Mol Biol*. 2012;810:1-6. Epub 2011/11/08.
35. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1817(6):851-62. Epub 2011/09/20.
36. Mammucari C, Gherardi G, Zamparo I, Raffaello A, Boncompagni S, Chemello F, et al. The mitochondrial calcium uniporter controls skeletal muscle trophism in vivo. *Cell reports*. 2015;10(8):1269-79. Epub 2015/03/04.
37. Tarasov AI, Semplici F, Ravier MA, Bellomo EA, Pullen TJ, Gilon P, et al. The mitochondrial Ca²⁺ uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic beta-cells. *PLoS one*. 2012;7(7):e39722. Epub 2012/07/26.
38. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476(7360):341-5. Epub 2011/06/21.
39. Hinkle PC. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1706(1-2):1-11. Epub 2004/12/29.
40. Evans AM, Hardie DG, Galione A, Peers C, Kumar P, Wyatt CN. AMP-activated protein kinase couples mitochondrial inhibition by hypoxia to cell-specific Ca²⁺ signalling mechanisms in

oxygen-sensing cells. *Novartis Foundation symposium*. 2006;272:234-52; discussion 52-8, 74-9. Epub 2006/05/12.

41. Alonso MT, Villalobos C, Chamero P, Alvarez J, Garcia-Sancho J. Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell calcium*. 2006;40(5-6):513-25. Epub 2006/10/28.

42. Cortassa S, Aon MA, Marban E, Winslow RL, O'Rourke B. An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophysical journal*. 2003;84(4):2734-55. Epub 2003/04/02.

43. Williams GS, Boyman L, Chikando AC, Khairallah RJ, Lederer WJ. Mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(26):10479-86. Epub 2013/06/14.

44. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(9):566-78. Epub 2012/08/02.

45. Carafoli E. The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen? *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1797(6-7):595-606. Epub 2010/04/14.

46. O'Donnell JM, Doumen C, LaNoue KF, White LT, Yu X, Alpert NM, et al. Dehydrogenase regulation of metabolite oxidation and efflux from mitochondria in intact hearts. *The American journal of physiology*. 1998;274(2 Pt 2):H467-76. Epub 1998/03/05.

47. Wan B, LaNoue KF, Cheung JY, Scaduto RC, Jr. Regulation of citric acid cycle by calcium. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(23):13430-9. Epub 1989/08/15.

48. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476(7360):336-40. Epub 2011/06/21.

49. Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman NE, Zhang X, Guo S, Kolesar JE, et al. Ca²⁺ signals regulate mitochondrial metabolism by stimulating CREB-mediated expression of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter gene MCU. *Science signaling*. 2015;8(366):ra23. Epub 2015/03/05.
50. Logan CV, Szabadkai G, Sharpe JA, Parry DA, Torelli S, Childs AM, et al. Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nature genetics*. 2014;46(2):188-93. Epub 2013/12/18.
51. De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T. Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annual review of biochemistry*. 2016;85:161-92.
52. Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, et al. The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *The EMBO journal*. 2013;32(17):2362-76. Epub 2013/08/01.
53. Mallilankaraman K, Cardenas C, Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golendar T, et al. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nature cell biology*. 2015;17(7):953.
54. Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovacs-Bogdan E, Kamer KJ, Udeshi ND, et al. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science*. 2013;342(6164):1379-82.
55. Murgia M, Rizzuto R. Molecular diversity and pleiotropic role of the mitochondrial calcium uniporter. *Cell calcium*. 2015;58(1):11-7.
56. Kovacs-Bogdan E, Sancak Y, Kamer KJ, Plovanich M, Jambhekar A, Huber RJ, et al. Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(24):8985-90.

57. Vais H, Mallilankaraman K, Mak DO, Hoff H, Payne R, Tanis JE, et al. EMRE Is a Matrix Ca(2+) Sensor that Governs Gatekeeping of the Mitochondrial Ca(2+) Uniporter. *Cell reports*. 2016;14(3):403-10.
58. Antony AN, Paillard M, Moffat C, Juskeviciute E, Correnti J, Bolon B, et al. MICU1 regulation of mitochondrial Ca(2+) uptake dictates survival and tissue regeneration. *Nature communications*. 2016;7:10955.
59. Mallilankaraman K, Doonan P, Cardenas C, Chandramoorthy HC, Muller M, Miller R, et al. MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca(2+) uptake that regulates cell survival. *Cell*. 2012;151(3):630-44.
60. Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, et al. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature*. 2010;467(7313):291-6.
61. Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, et al. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular cell*. 2014;53(5):726-37. Epub 2014/02/25.
62. Paillard M, Csordas G, Szanda G, Golenar T, Debattisti V, Bartok A, et al. Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca²⁺ Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU. *Cell reports*. 2017;18(10):2291-300.
63. Diaz-Vegas AR, Cordova A, Valladares D, Llanos P, Hidalgo C, Gherardi G, et al. Mitochondrial Calcium Increase Induced by RyR1 and IP3R Channel Activation After Membrane Depolarization Regulates Skeletal Muscle Metabolism. *Frontiers in physiology*. 2018;9:791. Epub 2018/07/11.
64. Alam MR, Groschner LN, Parichatikanond W, Kuo L, Bondarenko AI, Rost R, et al. Mitochondrial Ca²⁺ uptake 1 (MICU1) and mitochondrial ca²⁺ uniporter (MCU) contribute to

metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(41):34445-54. Epub 2012/08/21.

65. Zampieri S, Mammucari C, Romanello V, Barberi L, Pietrangelo L, Fusella A, et al. Physical exercise in aging human skeletal muscle increases mitochondrial calcium uniporter expression levels and affects mitochondria dynamics. *Physiological reports*. 2016;4(24). Epub 2017/01/01.

66. Qiu J, Tan YW, Hagenston AM, Martel MA, Kneisel N, Skehel PA, et al. Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nature communications*. 2013;4:2034. Epub 2013/06/19.

67. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular pharmacology*. 2003;64(4):785-95. Epub 2003/09/23.

68. Nemani N, Shanmughapriya S, Madesh M. Molecular regulation of MCU: Implications in physiology and disease. *Cell calcium*. 2018;74:86-93. Epub 2018/07/07.

69. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics*. 2008;9(2):102-14. Epub 2008/01/17.

70. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97. Epub 2004/01/28.

71. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):143. Epub 2016/05/21.

72. Marchi S, Lupini L, Patergnani S, Rimessi A, Missiroli S, Bonora M, et al. Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. *Current biology : CB*. 2013;23(1):58-63. Epub 2012/12/19.

73. Hong Z, Chen KH, DasGupta A, Potus F, Dunham-Snary K, Bonnet S, et al. MicroRNA-138 and MicroRNA-25 Down-regulate Mitochondrial Calcium Uniporter, Causing the Pulmonary Arterial Hypertension Cancer Phenotype. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2017;195(4):515-29. Epub 2016/09/21.
74. Picard M, Csukly K, Robillard ME, Godin R, Ascah A, Bourcier-Lucas C, et al. Resistance to Ca²⁺-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;295(2):R659-68. Epub 2008/05/23.
75. Picard M, Hepple RT, Burelle Y. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *American journal of physiology Cell physiology*. 2012;302(4):C629-41. Epub 2011/10/28.
76. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological reviews*. 2000;80(3):1215-65. Epub 2000/07/14.
77. Hurst S, Hoek J, Sheu SS. Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2017;49(1):27-47. Epub 2016/08/09.
78. McCormack JG, Denton RM. The role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism and energy production in rat heart. *Molecular and cellular biochemistry*. 1989;89(2):121-5. Epub 1989/09/07.
79. Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;290(3):C844-51. Epub 2005/10/28.

80. Knechtle B, Knechtle P, Wirth A, Alexander Rust C, Rosemann T. A faster running speed is associated with a greater body weight loss in 100-km ultra-marathoners. *Journal of sports sciences*. 2012;30(11):1131-40. Epub 2012/06/07.

81. Benziene B, Burton TJ, Scanlan B, Galuska D, Canny BJ, Chibalin AV, et al. Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;295(6):E1427-38. Epub 2008/10/02.