

UACH-FC  
MAG-B  
081  
C.1

**EFECTO DE HIPOXIA SOBRE LA  
ACTIVACIÓN DE ERKS EN MÚSCULO  
ESQUELÉTICO: REGULACIÓN POR CALCIO**

**Tesis**

**Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Biología  
Molecular, Celular Y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**César Alberto Osorio Fuentealba  
Marzo, 2007**

**Directora de Tesis: Dra. Cecilia Hidalgo  
Co-Directora: Dra. M. Angélica Carrasco Friz**



**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**CÉSAR ALBERTO OSORIO FUENTEALBA**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 16 de Enero de 2007.

Director de Tesis:

Dra. Cecilia Hidalgo Tapia

.....  
*C. Hidalgo*

Co-Director de Tesis

Dra. María Angélica Carrasco Friz

.....  
*M. Carrasco*

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Cecilia Vergara

.....  
*C. Vergara*

Dr. Daniel Wolf

.....  
*D. Wolf*

Dra. Lee Meisel

.....  
*L. Meisel*





**Dedicada a mi amada esposa e hijos, quienes me apoyaron y brindaron su amor en todo tiempo, ellos fueron parte de todo el sacrificio que significó llegar al final de esta etapa.**



CESAR OSORIO FUENTEALBA, Nació en Santiago el 1 de diciembre de 1971, el primero de tres hijos del matrimonio de don Luis Osorio y Elena Fuentealba. Casado con Carol Pacheco y padre de tres hijos Francisco Javier, Gabriel Hernán y María Elena. El año 1997 egresa de la carrera de Kinesiología, Universidad de Chile. Desarrolló labores propias de su profesión en distintos clubes de fútbol, entre los cuales se destacan Palestino S.A., Colo-Colo y Audax Club Sportivo Italiano.

El año 2003 ingresa al programa de Magister en Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, el mismo año inicia su labor como Académico en la Universidad Finis Terrae, el 2005 se incorpora como Académico en la Universidad Católica del Maule desempeñándose hasta el 2006.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de Tesis, las doctoras Cecilia Hidalgo y María Angélica Carrasco por su apoyo, rigurosidad científica y confianza.

Agradecer a toda la gente del Laboratorio, Juan Antonio Valdés por su "gran aporte en esta Tesis", más que un compañero fuiste y eres un amigo, gran apoyo en lo personal y académico, Juan Ríos simplemente maestro, Mónica Silva por su gran ayuda en los cultivos celulares, Nancy Leal por su buena disposición y simpatía, Marioly Muller por su infinita paciencia y buena disposición, José Galaz por su amistad y simpatía, José Miguel Eltit quien siempre tuvo una excelente disposición para aclarar todas mis dudas, de seguro llegarás muy lejos en tu carrera científica, Alejandra Espinosa por su buena onda y consejos, Rodrigo Maass por su amistad y ayuda en el uso de la cámara de hipoxia, Genaro Barrientos por su ayuda a desentrañar los misterios de Word y otros programas, Eduardo Gaggero, Luis Montecinos, Paola Llanos, Alejandro Chamorro, J.P. Finkelstein, Alexis Humeres, Álvaro Álvarez, Tatiana Adarme y Mario Bustamante. Agradecer al personal técnico don Fernando y Soledad por su buena disposición y simpatía. Especial mención para los Dres. Ricardo Bull por permitirme usar la cámara de hipoxia y Jorge Hidalgo por su buen humor y prontitud para aclarar todas mis dudas.

Agradecer a la comisión evaluadora de Tesis por sus ceteros comentarios y aportes al desarrollo de la misma.

A la escuela de postgrado y a todos los integrantes del comité del año 2003 por haber creído en mí, espero haber cumplido.

Finalmente a todos los que aportaron de una u otra forma a mi formación durante estos años de forma desinteresada.

Financiado por los proyectos **FONDAP** 15010006 y **FONDECYT** 1030988.



## INDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>Factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) .....</b>	<b>3</b>
<b>Señalización vía MAP quinasas y su relación con hipoxia .....</b>	<b>9</b>
<b>Otros factores de transcripción relacionados con hipoxia ..</b>	<b>14</b>
<b>RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES MÁS RELEVANTES.....</b>	<b>15</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>Hipoxia.....</b>	<b>20</b>



<b>Lisis de Células .....</b>	<b>21</b>
<b>Determinación de proteínas.....</b>	<b>22</b>
<b>Western Blot.....</b>	<b>22</b>
<b>Plasmidios reporteros.....</b>	<b>23</b>
<b>Reportero de normalización cotransfectado.....</b>	<b>24</b>
<b>Preparación de DNA plasmidial .....</b>	<b>25</b>
<b>Amplificación de plasmidios.....</b>	<b>25</b>
<b>Purificación del DNA plasmidial .....</b>	<b>26</b>
<b>Transfección de mioblastos.....</b>	<b>26</b>
<b>Ensayos luciferasa .....</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>Optimización de las condiciones de hipoxia .....</b>	<b>28</b>
<b>Activación de ERKs mediada por hipoxia.....</b>	<b>32</b>
<b>Efecto de la ausencia de calcio externo en la activación de ERKs durante hipoxia.....</b>	<b>34</b>

<b>Efecto de nifedipina en la activación de ERKs durante hipoxia.....</b>	<b>36</b>
<b>Efecto de ryanodina en la activación de ERKs durante hipoxia.....</b>	<b>38</b>
<b>Efecto de ausencia de calcio externo y presencia de ryanodina en la activación de ERKs durante hipoxia .....</b>	<b>40</b>
<b>Efecto de N-Acetilcisteína en la activación de ERKs durante hipoxia.....</b>	<b>42</b>
<b>Activación de la transcripción mediada por NF-kB y NFAT inducida por hipoxia en cultivo primario de miotubos.....</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b><i>Efectos de hipoxia sobre ERK en músculo esquelético .....</i></b>	<b><i>47</i></b>
<b><i>Papel del calcio en la estimulación de ERK por hipoxia .....</i></b>	<b><i>48</i></b>
<b><i>La estimulación de ERK por hipoxia involucra ROS .....</i></b>	<b><i>51</i></b>
<b><i>Estimulación de factores de transcripción por hipoxia .....</i></b>	<b><i>54</i></b>
<b><i>Estimulación de genes tempranos por hipoxia .....</i></b>	<b><i>57</i></b>

**CONCLUSIONES ..... 59**

**PROYECCIONES ..... 60**

**BIBLIOGRAFÍA..... 62**



## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> .....	<b>5</b>
<b>FIGURA 2.</b> .....	<b>6</b>
<b>FIGURA 3.</b> .....	<b>11</b>
<b>FIGURA 4.</b> .....	<b>30</b>
<b>FIGURA 5.</b> .....	<b>31</b>
<b>FIGURA 6.</b> .....	<b>33</b>
<b>FIGURA 7.</b> .....	<b>35</b>
<b>FIGURA 8.</b> .....	<b>37</b>
<b>FIGURA 9.</b> .....	<b>39</b>
<b>FIGURA 10.</b> .....	<b>41</b>
<b>FIGURA 11.</b> .....	<b>43</b>
<b>FIGURA 12.</b> .....	<b>45</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

- AP-1: proteína activadora 1  
Ara C: Arabidósido de citosina  
ATP: adenosin trifosfato  
Bp: pares de bases  
BSA: albúmina de suero de bovino  
BS: suero de bovino  
cAMP: AMP cíclico  
Ca<sup>+2</sup>: ion calcio  
CaMK: calcio/calmodulina kinasa  
CBP: proteína de unión a CREB  
COCl<sub>2</sub>: cloruro de Cobalto  
CRE: elemento de respuesta a cAMP  
CREB: proteína de unión al elemento CRE  
DAG: diacilglicerol  
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium  
DMEM-F12: Dulbecco's modified Eagle medium-F12  
DNA: acido desoxirribonucleico  
DHPR: Receptor de dihidropiridinas  
DMSO: dimetilsulfoxido  
DPI: difeniliodonio  
DTT: ditiotreitol  
EDTA: acido etilendiaminotetraacético  
EGTA: acido etilenglicol-bis-(b-aminoetileter)-N,N,N,N-2  
etanosulfónico  
ERK: proteína kinasa regulada extracelularmente  
FBS: suero fetal bovino  
GAPDH: gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa

HEPES: ácido N-2 hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico  
HIF-1: factor de transcripción inducido por Hipoxia 1  
HRE: elemento de respuesta a hipoxia  
IgG: inmunoglobulina G  
IL-6: interleuquina 6  
IP3: inositol 1,4,5- trisfosfato  
IP3R: receptor de IP3  
JNK: quinasa N-terminal de c-jun  
LB: medio Luria  
Luc: luciferasa  
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos  
NAC: N-acetilcisteína  
NADPH: nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato  
NAFT: factor nuclear de células T activadas  
NF-kB: factor nuclear kappa B  
NOX: oxidasa de NADPH  
PAS: proteína con dominios PER, ARNT, SIM  
P38 MAPK: proteína quinasa de 38 Kda activada por mitógenos  
PBS: tampón fosfato salino  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PERK: proteína quinasa regulada extracelularmente fosforilada  
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa  
PKC: proteína quinasa C  
PLC: fosfolipasa C  
PO<sub>2</sub> : presión parcial de oxígeno  
RLU: unidades relativas de luz  
ROS: especies reactivas de oxígeno.  
RS: retículo sarcoplasmático  
Rya: ryanodina  
RyR: receptor de ryanodina  
SAPK: proteína quinasa regulada por estrés

SDS: dodecil sulfato de sodio  
SERCA: bomba de calcio del retículo sarco/endoplasmático  
SRE: elemento de respuesta a suero  
SOD: enzima superóxido dismutasa  
TBE: tris-borato- EDTA  
TBS: tampón tris salino  
TE: tris EDTA  
TH: enzima.Tirosina Hidroxilasa  
Tris: tris-(hidroximetil)-aminoetano  
UA: unidades arbitrarias  
VEGF: factor de crecimiento vascular del endotelio  
VHL: proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau

## RESUMEN

El músculo esquelético es capaz de responder a hipoxia así como a ejercicio mediante cambios en la expresión génica. Los mecanismos tempranos implicados en las respuestas adaptativas inducidas por hipoxia en músculo esquelético son poco conocidos. En esta tesis se abordó principalmente el estudio de la activación de las MAP quinasas ERK1/2 y la posible participación del calcio en esa activación, como parte de los eventos iniciales que llevan a cambios en la expresión génica en células musculares sometidas a hipoxia. Cultivos primarios de músculo esquelético de rata fueron expuestos a hipoxia (1-2% O<sub>2</sub>) en un medio fisiológico por tiempos de 10 hasta 60 min. La fosforilación de ERK1/2 fue determinada por Western blot. La participación de calcio en la activación de la fosforilación de ERKs fue determinada exponiendo las células a hipoxia en ausencia de calcio externo, o en presencia de nifedipina, un inhibidor de los canales de calcio tipo L, o de ryanodina para bloquear la liberación de calcio desde depósitos intracelulares mediada por receptores de ryanodina. Se evaluó además la participación de ROS utilizando N-acetilcisteína. De manera preliminar estudiamos la activación de la transcripción dependiente

de NF- $\kappa$ B y NFAT en respuesta a hipoxia utilizando ensayos de genes reporteros.

La fosforilación de ERK1/2 aumentó en forma transitoria, aumentando 2 veces respecto al control a los 20-30 min. de exposición a hipoxia. La ausencia de calcio externo así como la presencia de nifedipina, ryanodina o N-acetilcisteína bloquearon parcialmente el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducido por hipoxia. La combinación de la ausencia de calcio externo y la presencia de ryanodina eliminó completamente este aumento. De estos resultados se puede concluir que el aumento de la fosforilación de las ERKs inducida por hipoxia es totalmente dependiente de calcio.

La hipoxia activó la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B y NFAT en 5 y 11 veces, respectivamente. Estos factores de transcripción son dependientes de calcio en músculo esquelético estimulado por despolarización, lo cual hace necesario estudiar la regulación por calcio de ambos factores frente a hipoxia.

## SUMMARY

In many cell systems, the response to hypoxia is a complex event involving the regulation of multiple signaling pathways and the coordinated expression of conceivably hundreds of genes. Skeletal muscle responds to hypoxia, exercise or electrical stimulation with changes in the expression of structural proteins and enzymes of the energetic metabolism, but the mechanisms involved in hypoxia-induced gene expression remain to be clarified. Accordingly, the aim of this work was to study the early events that lead to changes in gene expression in skeletal muscle cells in response to hypoxia, mainly the possible role of calcium in eliciting these changes. Primary cultures of rat skeletal muscle cells were exposed at room temperature to hypoxic conditions (1-2% O<sub>2</sub>) for 10 to 60 min and ERK1/2 phosphorylation was determined by Western blot analysis. The role of calcium was assessed by exposing cells to hypoxia in the absence or presence of physiological external calcium, or by using cells pre-incubated with nifedipine (an L-type calcium channel blocker), ryanodine (to inhibit calcium release through RyR channel from the sarcoplasmic reticulum) or N-acetylcysteine (a membrane permeant reducing agent). Transcription mediated by NF- $\kappa$ B and NFAT was assessed

with luciferase reporter genes, measuring the luminescence of cell lysates. ERK 1/2 phosphorylation increased two-fold after 10-30 min of cell incubation under hypoxic conditions, and decreased thereof reaching basal levels at 1 h. Pre-incubation with ryanodine, nifedipine or N-acetylcysteine, or external calcium removal, partially reduced hypoxia-induced ERK1/2 activation. Yet, in cells pre-incubated with ryanodine, external calcium removal completely prevented the ERK1/2 phosphorylation increase induced by hypoxia. It has been reported that depolarization of skeletal muscle activates the transcription factors NF- $\kappa$ B and NFAT via calcium-dependent signals. Likewise, we obtained preliminary results indicating that hypoxia activated transcription mediated by NF- $\kappa$ B and NFAT by 5- and 11-fold, respectively. Our results suggest that the increased ERK1/2 phosphorylation induced by exposing skeletal muscle cells in primary culture to hypoxia requires both calcium entry and sarcoplasmic reticulum calcium release and that is totally dependent on calcium.

## INTRODUCCIÓN

El tejido muscular tiene la capacidad de responder con cambios tanto en estructura como en función, a estímulos que modifican su actividad contráctil tales como ejercicios de resistencia, estimulación eléctrica y denervación, como también a estímulos que actúan sobre la carga muscular como microgravedad y entrenamiento muscular de sobrecarga. Además, factores ambientales, tal vez menos estudiados, pero no menos importantes como la hipoxia y el estrés térmico, influyen sobre el músculo esquelético induciendo cambios adaptativos.

Las células de mamíferos requieren de un aporte constante de oxígeno para mantener una adecuada producción energética que asegure un normal funcionamiento y la sobrevivencia celular. Un evento de hipoxia, que corresponde a la disminución en el aporte de oxígeno a nivel tisular o cuando la demanda de oxígeno de un tejido en particular excede el suministro del mismo, puede ser visto como una condición de estrés ambiental ante la cual los organismos tienen la capacidad de adaptarse (Hoppeler y Vogt, 2001b; Laderoute y col., 2002). En seres humanos sometidos a bajas concentraciones de oxígeno durante una ascensión a los

Himalayas, se ha encontrado una disminución del área de sección transversal muscular y de la densidad mitocondrial (Hoppeler y col., 1990; Hoppeler y col., 2003). El entrenamiento físico en condiciones de hipoxia intermitente puede inducir un aumento en la transferencia de oxígeno a las mitocondrias, debido a incrementos tanto del lecho capilar muscular como del contenido muscular de mioglobina (Fluck y Hoppeler, 2003; Vogt y col., 2001). A su vez el entrenamiento muscular de resistencia bajo condiciones de hipoxia produce cambios en el metabolismo muscular aumentando la oxidación de carbohidratos, este cambio es inducido por activación de enzimas glicolíticas (Wenger y Gassmann, 1997; Vogt y col., 2001).

Los cambios en la expresión génica mediados por hipoxia, en diferentes tejidos, tales como músculo cardíaco, endotelio vascular y riñón, son relativamente conocidos. Sin embargo, los cambios en la expresión génica en músculo esquelético como consecuencia de la hipoxia han sido poco estudiados. Por esta razón es que consideramos interesante estudiar los fenómenos de regulación de factores transcripcionales bajo condiciones de hipoxia en células de músculo esquelético de rata en cultivo primario. En este modelo celular se conoce que la despolarización, inducida por altas concentraciones de potasio extracelular, resulta en aumento de la expresión de genes tempranos y que el calcio juega un rol

fundamental en este proceso (Carrasco y col., 2003). Este cambio en la expresión génica involucra la señalización por quinasas de la vía ERK (Carrasco y col., 2003), que a su vez dependen de calcio para su activación. Dado que la vía ERK activa varios factores transcripcionales y que es a su vez activada en numerosos procesos que inducen cambios en expresión génica, en esta tesis se ha abordado el estudio de la activación de ERKs mediada por hipoxia y su dependencia de calcio.

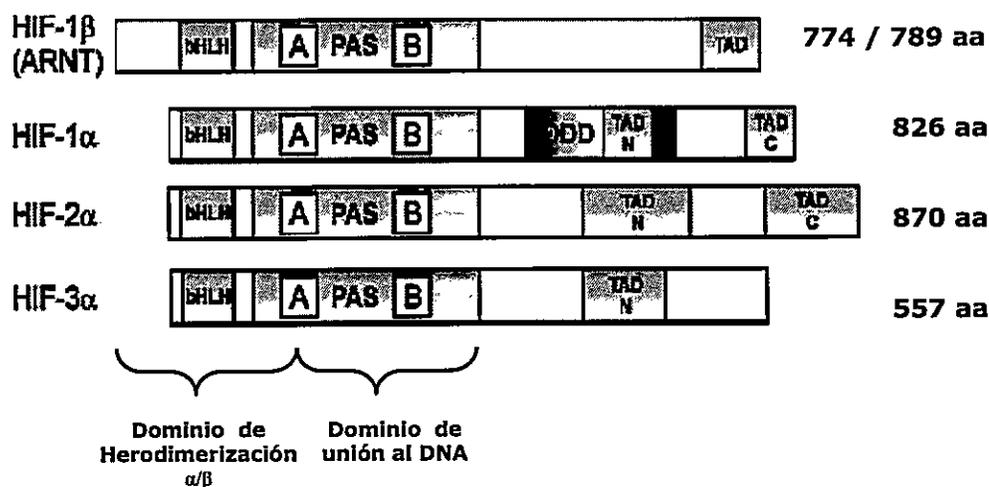
Se ha demostrado en numerosos tipos celulares que durante episodios de hipoxia la inducción de genes requiere en su mayoría de respuestas transcripcionales mediadas por el factor de transcripción 1 inducido por hipoxia (HIF-1), el cual es un heterodímero que es estabilizado en condiciones de hipoxia. Muy importante para esta tesis es que en diferentes estudios se ha visto que la respuesta celular frente a hipoxia implica cambios en los niveles de calcio intracelular, ya sea aumento o disminución. Frente a un aumento del calcio, se ha descrito la activación de diversas vías de señalización intracelular. Estos y otros antecedentes serán desarrollados a continuación.

### **Factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1)**

HIF-1 es una de las moléculas más importantes implicadas en la respuesta de células de mamíferos frente a hipoxia, controlando

la expresión de varios cientos de genes en respuesta a este estímulo ambiental (Adhikary y col., 2000; Fluck y Hoppeler, 2003; Toescu, 2004; Wenger y col., 2005), que incluyen genes relacionados a vascularización y angiogénesis, eritropoyesis y metabolismo del hierro, metabolismo de glucosa y supervivencia celular (Bracken y col., 2003; Soucek y col., 2003). En músculo esquelético humano se ha demostrado inducción del mRNA de HIF-1 $\alpha$  después de entrenamiento de resistencia de alta o baja intensidad en condiciones de hipoxia, (Vogt y col., 2001). Estos y otros resultados en músculo (Hoppeler y Vogt, 2001a; Hoppeler y Vogt, 2001b; Hoppeler y col., 2003; Ventura y col., 2003; Vogt y col., 2001) sugieren que además del estímulo mecánico (contráctil) la hipoxia también es responsable de algunas adaptaciones musculares. En esta tesis utilizamos el nivel de expresión de HIF-1 $\alpha$  como control de la condición experimental de hipoxia.

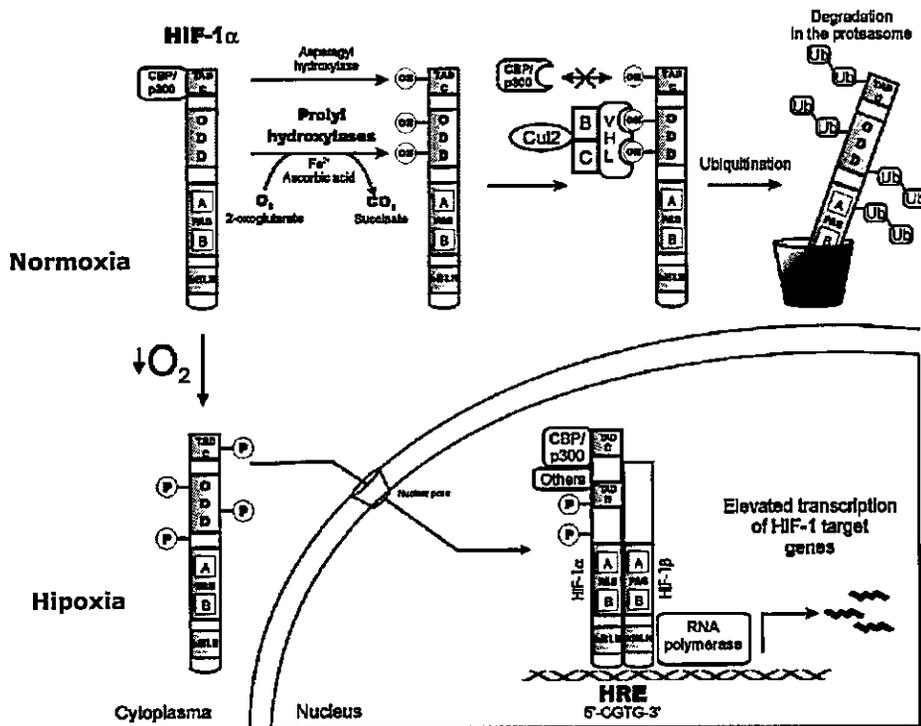
HIF-1 es un heterodímero que posee dos subunidades: la subunidad alfa (HIF- $\alpha$ ) con tres isoformas (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ) que se acumula durante hipoxia, y la subunidad beta (HIF-1 $\beta$ ) que está expresada constitutivamente (Figura 1) (Wang y col., 1995; Wenger y col., 2005).



**Figura 1.**

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1). Ambas subunidades comparten características estructurales, contienen un dominio básico hélice-vuelta-hélice (bHLH) y un dominio PAS (PER, ARNT, SIM). El dominio básico y el extremo carboxilo del dominio PAS son requeridos de manera específica para la unión al DNA de HIF-1, en tanto que el dominio HLH y el extremo amino del dominio PAS son responsables de la formación del heterodímero HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  que tiene la capacidad de reclutar a los coactivadores transcripcionales p300 y a la proteína CBP que se une a CREB (p300/CBP) uniéndose así al DNA en secuencias específicas llamadas elementos de respuesta a hipoxia (HRE). Figura tomada y modificada de Hopfl y col., 2004.

En condiciones de normoxia, HIF-1 se degrada rápidamente por lo que no se une al DNA y por tanto, no se expresan los genes inducibles por hipoxia (Figura 2). Durante períodos de hipoxia o en presencia de quelantes de hierro, se inhibe la degradación de HIF-1 $\alpha$ , que se acumula rápidamente en el núcleo (Jiang y col., 1996; Jewell y col., 2001).



**Figura 2.**

Mecanismo de degradación de HIF-1: En normoxia, HIF-1 $\alpha$  es proli-hidroxilada en 2 residuos de prolina (Pro 402 y Pro 564) promoviendo la unión de la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL) y su posterior degradación vía proteosoma (Bruick y McKnight, 2001; Toescu, 2004; Wenger y col., 2005) en tanto la hidroxilación del residuo de asparagina 803 en el dominio de transactivación impide la unión del coactivador CBP/p300. En condiciones de hipoxia HIF-1 $\alpha$  es fosforilada y trasloca al núcleo en donde dimeriza con HIF-1 $\beta$ , formando HIF-1 reclutando varios coactivadores, regulando así la expresión de genes sensibles a hipoxia (figura tomada y modificada de Hopfl y col., 2004).

## **Señalización mediada por calcio e hipoxia**

La señalización mediada por calcio desempeña un importante papel en la regulación de una amplia variedad de procesos celulares básicos tales como fertilización, adhesión, movilidad, proliferación y muerte celular (Berridge y col., 2000; Carafoli, 2002; Petersen, 2002). Su papel en la mediación de procesos celulares adaptativos que involucran cambios en la expresión génica está ampliamente estudiado (Bootman y col., 2002; Carafoli, 2002; Berridge y col., 2003; Dolmetsch, 2003).

En el último tiempo el calcio ha sido implicado en la mediación y regulación de la respuesta a hipoxia en varios tipos celulares (Toescu, 2004). Durante la fase aguda de la respuesta hipóxica en varios tipos celulares, tales como músculo liso pulmonar, células tipo I del cuerpo carotídeo y células PC12, se ha visto un aumento de la concentración de calcio intracelular que requiere de calcio extracelular (Seta y col., 2004). Las células PC12 sometidas a hipoxia exhiben una rápida respuesta de despolarización de membrana, mediada por la inhibición de canales de potasio sensibles a oxígeno (Kv 1.2), lo que induce la activación de canales de calcio dependientes de voltaje y el aumento del calcio intracelular (Seta y col., 2004). Tanto en células tipo I del cuerpo carotídeo como en células PC12, el incremento del calcio intracelular inducido por hipoxia es inhibido por bloqueo

farmacológico de canales de calcio voltaje-dependientes (Seta y col., 2004).

Después de dos horas de exponer a hipoxia células endoteliales o neuronas se ha observado un aumento significativo del calcio intracelular, que proviene de calcio liberado de depósitos intracelulares vía el receptor de ryanodina (RyR) (Salnikow y col., 2002). Se han reportado resultados diferentes en cardiomiocitos aislados de ratas tratadas crónicamente con hipoxia por períodos de 21 a 28 días (Pei y col., 2003), en los cuales la hipoxia induce una marcada disminución de las señales transitorias de calcio inducidas por cafeína (activador de RyR) respecto a los cardiomiocitos aislados desde los animales control (Pei y col., 2003; Pei y col., 2000). Se determinó que en estas condiciones el contenido de calcio en el retículo sarcoplasmático (RS) de los cardiomiocitos estaba disminuído como consecuencia de una supresión significativa tanto de la recaptación de calcio, vía bomba de calcio del retículo sarco(endo)plasmico (SERCA), como de la liberación del mismo a través del RyR. Cabe destacar que la expresión de la SERCA se encontró claramente disminuida en esta condición de hipoxia crónica, en cambio los niveles de expresión del RyR no sufrieron ningún cambio, sugiriendo que la reducción del contenido de calcio al interior del retículo sarcoplasmático en

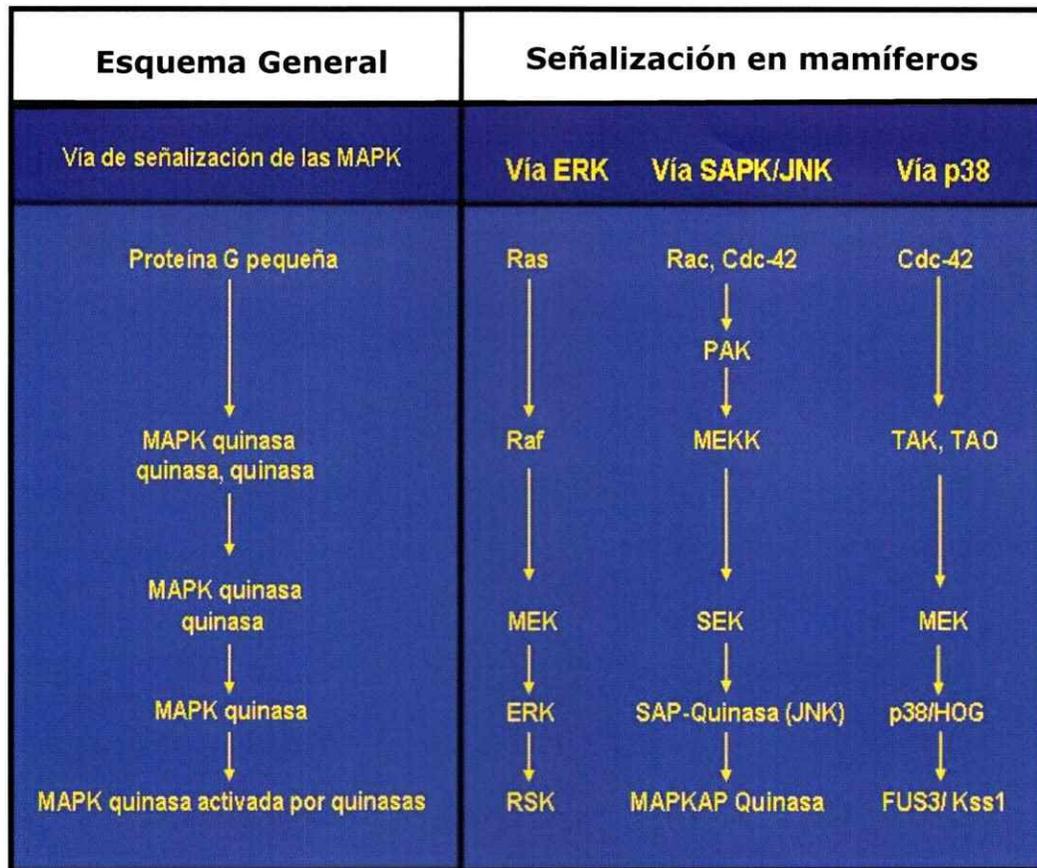
hipoxia crónica conlleva una disminución en la liberación de calcio vía RyR (Pei y col., 2003).

La regulación de la expresión génica por calcio es un proceso complejo, regulado por mecanismos citosólicos y/o nucleares que decodifican la especificidad de las señales de calcio en términos de amplitud, frecuencia, duración y oscilaciones además de sus propiedades espaciales (Dolmetsch y col., 1997; Dolmetsch y col., 1998; Petersen, 2002; Lewis, 2003). A nivel transcripcional se han delineado al menos tres mecanismos mediante los cuales el calcio regularía el proceso de expresión génica: a) activación de cascadas que llevan a fosforilaciones y desfosforilaciones que modifican las propiedades transactivantes de factores de transcripción o afectan la estructura del nucleosoma, b) interacciones proteína-proteína entre los sensores de calcio y factores de transcripción, c) cambios inducidos por calcio en las propiedades de unión de los sensores de calcio a sitios específicos en el DNA (Mellström y Naranjo, 2001).

### **Señalización vía MAP quinasas y su relación con hipoxia**

Las células son capaces de responder a señales extracelulares transmitiéndolas al medio intracelular para coordinar respuestas adecuadas. Entre las vías de señalización usadas para transducir dichas señales se encuentra la cascada de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas son una

superfamilia de proteínas quinasas que se encuentran en todas las células eucarióticas y están implicadas en múltiples funciones celulares tales como, respuesta al estrés, supervivencia, proliferación, diferenciación y migración celular (Figura 3) (Cowan y Storey, 2003; Nishimoto y Nishida, 2006).



**Figura 3.**

Existen tres familias principales de proteínas quinasas en mamíferos, las extracelular signal-regulated protein kinases (ERKs), las c-Jun N-terminal kinases o stress-activated protein kinases (JNK/SAPK) y la familia de las p38. Estas proteínas citosólicas tienen actividad serina/treonina quinasa y pueden trasladarse al núcleo y activar genes de respuesta temprana. Algunos estímulos extracelulares como factores de crecimiento o condiciones de estrés ambiental inducen la activación secuencial de MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), MAPK quinasa (MAPKK) y MAPK (Cowan y Storey, 2003).

La activación de ERK1/2 promueve la fosforilación de muchos sustratos diversos y dependiendo del estímulo inicial de la cascada, se han identificado factores transcripcionales tales como Elk1, Ets1, Sap1a, c-Fos, SRC-1, MEF2, STAT3 y c-Myc, y proteínas quinasas tales como ribosomal S6 kinase (RSK), MAPKAP-1 y MSK.

Hay antecedentes sobre la participación de las tres vías de MAP quinasas regulando la expresión de genes por hipoxia (Seta y Millhorn, 2004). En células PC12 la hipoxia promueve la fosforilación de p38  $\alpha$  y p38  $\gamma$  así como también la fosforilación en residuos de tirosina de p42/p44 (ERK 1/2); en cambio la vía JNK no es activada. En células MCF7 la hipoxia induce la activación de JNK/SAPK pero no de ERKs (Mottet y col., 2002).

La proliferación inducida por hipoxia en fibroblastos vasculares involucra las ERKs (Seta y col., 2004) así como la estimulación de la expresión del factor de crecimiento endotelial (VEFG) que resulta en aumento de vascularización (angiogénesis) en tumores (Bracken y col., 2003; Seta y Millhorn, 2004). Además, se requiere de ERKs para la transactivación por hipoxia del complejo HIF-1 en células microvasculares endoteliales humanas 1 (HMEC-1) (Minet y col., 2000) y en células HepG2 (Mottet y col., 2003). Asimismo, la activación de las 3 vías de MAPKs ha sido asociada con efecto cardioprotector en células cardíacas después de hipoxia, preconditionamiento e isquemia (Seta y col., 2004).

La actividad fisiológica celular en general, y la hipoxia en particular, induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Davis y col., 1998; Yermolaieva y col., 2000; Toescu, 2004; Zuo y Clanton, 2005). Los ROS pueden modular la señalización intracelular a través de modificación redox de diversas proteínas, las que son estimuladas o inhibidas por esta modificación. Entre las proteínas blanco de modificación redox se encuentran canales iónicos como el RyR, proteína quinasas, proteína tirosina fosfatasas, factores de transcripción (Rhee y col., 2000; Droge, 2002; Fill y Copello, 2002; Chiarugi y Cirri, 2003; Bultynck y col., 2004).

Tanto el ejercicio como la hipoxia, la isquemia-reperfusión, la angiotensina II o la estimulación eléctrica promueven la generación de ROS en músculo esquelético (McArdle y col., 2001; Reid y Durham, 2002; Silveira y col., 2003; Wei y col., 2006; Zuo y Clanton, 2005), y se ha demostrado que el anión superóxido se forma efectivamente en miocitos y no en otras células presentes en el tejido muscular (McArdle y col., 2001).

Las ROS celulares incluyen oxígeno molecular, anión superóxido, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo (Droge, 2002). Es importante considerar la posibilidad que la hipoxia induzca la formación de ROS en nuestro modelo, pues hemos demostrado que la exposición de miotubos a  $H_2O_2$  induce

aumentos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e incrementa la fosforilación de ERK1/2 y CREB, así como los niveles de mRNA de los genes tempranos c-fos y c-jun (Espinosa y col., 2006). Todos estos efectos son inhibidos por concentraciones de ryanodina que suprimen la actividad del RyR, sugiriendo que la activación de RyR por ROS induce liberación de calcio que activa la fosforilación de ERK1/2, la que estimula a su vez CREB y los genes tempranos mencionados.

### **Otros factores de transcripción**

Dos factores de transcripción que han mostrado tener una participación importante en eventos de respuesta frente a diversos estímulos que implican cambios transitorios en las concentraciones intracelulares de calcio son NF- $\kappa$ B y NFAT (Crabtree y Olson, 2002; Hogan y col., 2003; Dolmetsch y col., 1998).

Se ha reportado que NF- $\kappa$ B se encuentra involucrado en los procesos de proliferación y diferenciación del miotubo, describiéndose además que en músculo adulto NF- $\kappa$ B se encuentra activado por hipoxia, ROS, ejercicio físico, contracción *in vitro* y por desgaste muscular (Cummins y Taylor, 2005; Hunter y col., 2002; Michiels y col., 2002; Seta y col., 2004). En corazón, aorta y pulmón de ratones expuestos a hipoxia crónica intermitente, así como en monocitos aislados de pacientes con apnea obstructiva del

sueño, se ha encontrado una elevada actividad de NF- $\kappa$ B la cual fue correlacionada con un aumento en la expresión de la enzima iNOS (Greenberg y col., 2006). El óxido nítrico (NO) regula la actividad de NF- $\kappa$ B, y a su vez este factor transcripcional regula la expresión de eNOS e iNOS (Michiels y col., 2001).

Se ha asociado la participación de Calcineurina-NFAT en procesos de proliferación, diferenciación y fusión de miotubos, además de la participación de la isoforma NFATc1 en procesos que llevan tanto a la hipertrofia de músculo esquelético como a la remodelación y regulación de genes específicos de fibras musculares lentas (Abbott y col., 1998; Musaro y col., 1999; Semsarian y col., 1999; Chin y col., 1998; Delling y col., 2000; Allen y Leinwand, 2002; Kubis y col., 2003; Liu y col., 2001; McCullagh y col., 2004; Schiaffino y Serrano, 2002; Olson y Williams, 2000).

Sin embargo, no existen antecedentes en la literatura que relacionen NFAT con hipoxia.

Dados los antecedentes expuestos, estudiamos de manera preliminar el efecto de hipoxia sobre los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y NFAT.

## **RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES MÁS RELEVANTES**

La hipoxia es un estímulo que induce cambios en la expresión génica en distintos tejidos, siendo poco conocidos los mecanismos que median esta respuesta en músculo esquelético. Uno de los principales reguladores transcripcionales activado por hipoxia es el factor de transcripción 1 inducido por hipoxia (HIF-1). Sin embargo, este no es el único factor que responde a la hipoxia, ya que diversas vías de señalización intracelular, incluyendo la MAP quinasa ERK en sus isoformas 1 y 2 que es un regulador transcripcional, son activadas por hipoxia y generan cambios en la expresión de diversos genes.

Se ha reportado en diversos sistemas celulares (pero no hay información sobre el músculo esquelético) que la respuesta aguda frente a hipoxia conlleva un aumento de calcio intracelular que proviene tanto desde el medio extracelular como desde depósitos internos. Hay antecedentes de generación de ROS durante hipoxia en músculo esquelético, lo que sugiere su participación en algunos de los procesos de señalización intracelular inducidos por este estímulo.

## **HIPÓTESIS**

La exposición a hipoxia de células musculares esqueléticas en cultivo activa el regulador transcripcional ERK por mecanismos que involucran el aumento del calcio intracelular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la activación de las MAPKs ERKs por hipoxia y el posible rol de calcio en esta activación en cultivo primario de músculo esquelético de rata.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Utilizando células de músculo esquelético en cultivo primario:

Determinar el efecto de hipoxia sobre la fosforilación de las MAPKs ERKs.

Determinar la participación del calcio extracelular y de la liberación de calcio mediada por RyR en la fosforilación de ERKs inducida por condiciones de hipoxia.

Estudiar la participación de especies reactivas de oxígeno en la activación de ERKs inducida por hipoxia.

Investigar en forma preliminar la activación de otros reguladores transcripcionales, como los factores de transcripción NF-kB y NFAT, por condiciones de hipoxia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivo primario de músculo esquelético de rata.**

El método utilizado fue el descrito por Carrasco y col., 2003. Ratas neonatas (0-24 horas) se sacrificaron por decapitación, obteniéndose células de las extremidades posteriores mediante disección fina y disgregación mecánica del tejido muscular en un pequeño volumen de una solución estéril de PBS. El tejido se sometió a digestión enzimática en 8 ml de 0,1% p/v de colagenasa en PBS durante 15 minutos con agitación suave, deteniendo la reacción mediante la adición de igual volumen de medio de cultivo DMEM/Ham F12 (1:1 v/v), 10% de suero bovino, 2,5% de suero fetal, 100 mg/l de penicilina, 50 mg/l de estreptomycin y 2,5 mg/l de fungizona B (medio completo). El tejido parcialmente digerido fue filtrado por mallas de nytex, y las células colectadas por centrifugación se resuspendieron en 10 ml de este mismo medio de cultivo. Se realizó pre-plaqueo de 50 minutos en cápsula de Petri de 150 mm, donde los fibroblastos que se adhieren más rápido a la placa son eliminados parcialmente. Las células fueron sembradas en placas gelatinizadas de 6 cm en medio completo. A las 72 horas se trataron con Ara-C para disminuir los fibroblastos. Para diferenciación, se eliminó el suero del medio de cultivo. De este

modo, se obtienen miotubos bien formados y con actividad contráctil al cabo de 6 o 7 días.

### **Hipoxia**

El cultivo primario de células musculares esqueléticas fue incubado previamente durante 30 minutos en medio de reposo fisiológico con calcio (NaCl 118 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, glucosa 10 mM, Hepes/Tris 20 mM y KCl 4,7 mM), o en medio sin calcio (NaCl 117,6 mM, MgCl<sub>2</sub> 4,2 mM, EGTA 0,5 mM, glucosa 10 mM, Hepes/Tris 20 mM y KCl 4,7 mM). Luego se expusieron a las condiciones de hipoxia en uno u otro medio por tiempos variables.

Cuando se usaron los distintos inhibidores farmacológicos las células fueron preincubadas durante 45 minutos en su presencia en todos los experimentos. Los pares control fueron incubados con el vehículo del respectivo inhibidor, las células nunca fueron expuestas a concentraciones mayores al 0,1 % de DMSO o de etanol, a estas concentraciones no hubo ningún tipo de respuesta en las células musculares. Tanto las células control como experimentales fueron sometidas al mismo número de cambios de medio para descartar diferencias debidas a la manipulación.

La hipoxia fue inducida bajo condiciones de temperatura ambiente, durante distintos períodos de tiempo, con presiones de oxígeno (PO<sub>2</sub>) de 10 mm de Hg, correspondientes a porcentajes de oxígeno de alrededor de 1% al 2%. Para la obtención de la

atmósfera baja en PO<sub>2</sub> se utilizó una cámara sellada de plexiglass de 100 l de capacidad, a la cual se le inyectó nitrógeno gaseoso al 100% desplazando el oxígeno hasta alcanzar las concentraciones señaladas previamente. Para medir el nivel de oxígeno ambiental dentro de la cámara se utilizó un analizador de gases (AD Instruments modelo ML 205) que envía una señal análoga filtrada a 400 Hz con un filtro de tipo Bessel de paso bajo, que se digitaliza a 2 kHz con un conversor A/D Digidata 1320A comandado por un PC dotado de disco duro de alta capacidad. Las señales digitalizadas se analizaron con el conjunto de programas pClamp8 (Axon Instruments, Inc, Foster City, California, USA).

### **Lisis de Células.**

Posterior al tratamiento con hipoxia, las células fueron solubilizadas a 4<sup>o</sup> C en 60 µl de tampón de lisis que contiene (en mM): Tris-HCl 50, pH 7,4, NaCl 150, EDTA 1, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5, NaF 20, con 1% NP-40 y cocktail de inhibidores de proteasas (Calbiochem). Se sonicaron por 1 minuto y luego de 30 minutos en hielo con agitación, el material insoluble fue removido por centrifugación. El sobrenadante que contenía las proteínas fue alicuotado y congelado a -20°C hasta su utilización.

### **Determinación de proteínas.**

Se determinó la concentración de proteínas presentes en el sobrenadante de los lisados celulares mediante el método descrito por Hartree (1972).

### **Western Blot.**

Las proteínas de los lisados celulares fueron hervidas con buffer de muestra denaturante (glicerol 10%, SDS 4,5 %,  $\beta$ -Mercaptoetanol 5%, Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,9), EDTA 1,5 mM y azul de bromofenol 0,1 %). Fueron cargados 50  $\mu$ g de proteína total para ERKs. Los polipéptidos se separaron por electroforesis en mini geles de 10% SDS-poliacrilamida y transferidos a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA). Luego de 1 lavado en una solución de TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 2M) durante 10 min, las membranas fueron bloqueadas a temperatura ambiente en solución de TBST (TBS con Tween-20 0,05%) con 3% de leche descremada durante 1 hora. La exposición al anticuerpo primario monoclonal P-ERK (Santa Cruz Biotechnology Inc) se realizó toda la noche a 4<sup>o</sup> C. Al día siguiente las membranas fueron lavadas con solución TBST durante 10 min. Dicho procedimiento fue realizado 3 veces. La incubación con anticuerpo secundario, conjugado con peroxidasa (Sigma anti-ratón IgG) fue realizada por 1 hora y 30 minutos, a temperatura ambiente, repitiendo el proceso de lavado de las

membranas para normalizar la carga de proteínas las membranas fueron deshibridizadas durante 30 min en un baño termorregulado a 50° C con agitación, en una solución tampón de deshibridización cuya composición es  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2% y Tris/HCl 62,5 mM a pH 6,7. Posteriormente las membranas fueron lavadas 2 veces a temperatura ambiente con agua destilada durante 10 min y 1 vez con TBS durante 10 min, repitiéndose el procedimiento anterior de inmunodetección con anticuerpo primario policlonal ERK-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc) y anticuerpo secundario, conjugado con peroxidasa (Pierce anti-conejo IgG).

Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia aumentada (ECL) según las especificaciones del fabricante (Amersham Biosciences UK Ltd.). El film fue escaneado y el análisis densitométrico de las bandas fue realizado con el programa Image J (NIH).

### **Plasmidios reporteros.**

Para realizar este estudio se dispuso de las siguientes construcciones:

**NF- $\kappa$ B 6X:** Plasmidio que contiene seis cajas consenso de unión para NF- $\kappa$ B clonadas en el sitio de policlonamiento para el vector reportero pGL3 Basic, que contiene el gen que codifica para la enzima luciferasa (Promega). Brevemente, el vector pGL3 fue

digerido con la enzima de restricción Xho I (Promega) de acuerdo a las condiciones mencionadas por el fabricante. Posteriormente fue desfosforilado y ligado con oligonucleótido que contiene seis sitios en tándem para la unión de NF- $\kappa$ B. La orientación del inserto fue chequeada por PCR del DNA plasmidial aislado desde los diversos clones.

**NFAT 15X:** Plasmidio que contiene el promotor del gen que codifica para la proteína MCIP1 que cuenta con 15 sitios naturales de unión para NFAT. Brevemente, utilizando partidores degenerados en su extremo 5' se logró amplificar una zona de 951 pb correspondiente al promotor del gen MCIP1 que codifica para una proteína endógena inhibitoria de Calcineurina (Rosenberg et. Al. 2004). Posteriormente este fragmento fue digerido utilizando Xho I y clonado en el sitio de policlonamiento de pGL3 Basic. La orientación del inserto fue chequeada por PCR del DNA plasmidial aislado desde los diversos clones.

**Reportero de normalización cotransfectado.** pRL-TK que contiene el gen para *Renilla* luciferasa bajo el promotor para tirosina kinasa (Promega).

### **Preparación de DNA plasmidial.**

Transformación de bacterias: Bacterias *E. coli* DH5a electrocompetentes (25  $\mu$ L D.O. 0,6-0,8 nm) fueron electroporadas en presencia de 0.01  $\mu$ g del plasmidio. A esta mezcla se agregó 1 ml de medio TB (Terrific Broth) y se incubó a 37°C por 30 minutos con agitación. 10 y 50  $\mu$ l de la suspensión de bacterias se esparcieron sobre una placa con agar 1% en medio Luria (LB) que contenía ampicilina 50  $\mu$ g/ml, como antibiótico de selección y se incubó toda la noche a 37° C. Las bacterias que completaron exitosamente la transformación formaron colonias discretas, las cuales se seleccionaron y expandieron en medio LB con ampicilina para luego ser congeladas a -80° C en glicerol al 50%.

### **Amplificación de plasmidios.**

La amplificación de plasmidios se llevó a cabo según procedimientos estándares. Brevemente 500 ml de medio LB con ampicilina 50  $\mu$ g/ml se inocularon con bacterias almacenadas en glicerol y se incubaron durante toda la noche a 37° C con agitación. Posteriormente las bacterias se colectaron por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C.

### **Purificación del DNA plasmidial.**

Se llevó a cabo mediante el kit "Plasmid Midi Kit" (QIAGEN). La determinación de la concentración de cada plasmidio se realizó determinando su absorbancia a 260/280 nm. La calidad del DNA plasmidial se evaluó en gel de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio y se comparó con el estándar 1 Kb DNA Mass Ladder.

### **Transfección de mioblastos.**

Los mioblastos de rata fueron sembrados y crecidos hasta alcanzar un 70% de confluencia aproximada al tercer día post-plaqueo. La transfección se realizó en medio DMEM-F12 sin suero y sin antibióticos, utilizando 3  $\mu$ l de FuGENE 6 (Roche), 0,9  $\mu$ g de vector reportero y 0,1  $\mu$ g de vector de normalización por placa en un volumen de 1.5 ml de medio DMEM-F12 por placa de 60 mm. Transcurrido 16 horas (overnight) a 37° C, el medio fue reemplazado por medio de diferenciación.

### **Ensayos luciferasa.**

Para los ensayos de luciferasa se utilizó el kit de Promega "Dual-luciferase reporter assay system" y la detección de luz se realizó en luminómetro Berthold F12. Brevemente 10  $\mu$ l de extracto celular se incubaron con 25  $\mu$ l de sustrato comercial LAR2 y se

cuantificaron en forma inmediata en el luminómetro, obteniéndose de esta manera la actividad luciferasa de cada lisado expresado como unidades relativas de luz (RLU/s). La actividad del vector de normalización se midió sobre el mismo extracto agregando 25  $\mu$ l del reactivo Stop & Glo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad luciferasa (razón LUC/*Renilla*) de los miotubos sometidos a hipoxia con respecto de aquellos sin estímulo.

## RESULTADOS

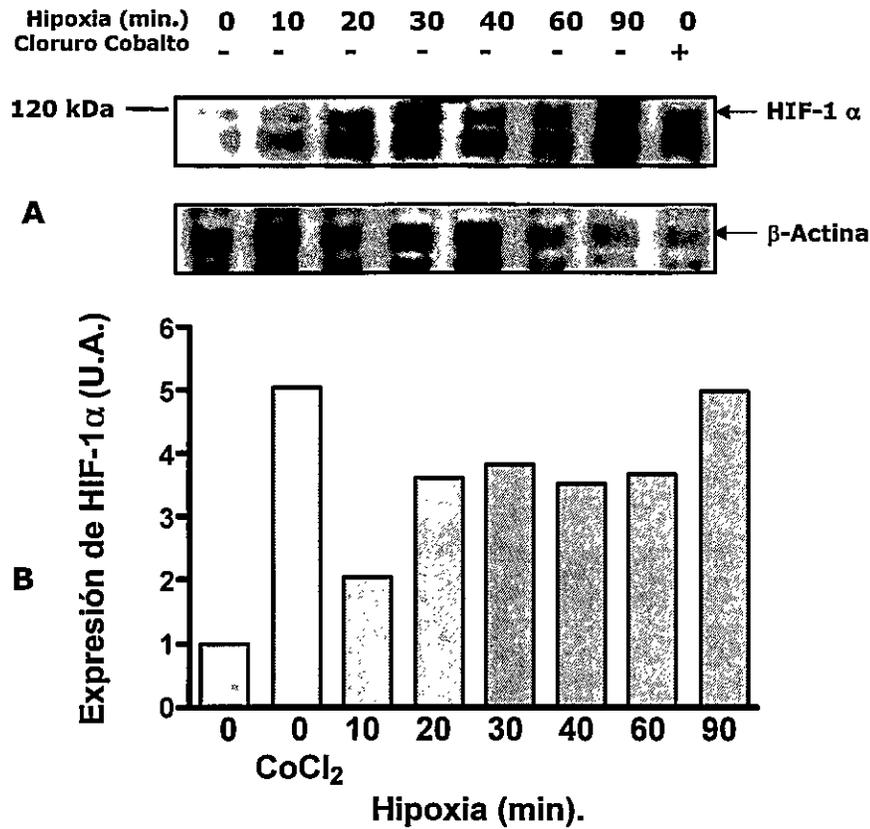
### Optimización de las condiciones de hipoxia

En la literatura se considera que hipoxia corresponde a niveles de 1% a 10% de oxígeno ambiental. No existen datos específicos respecto al nivel de oxígeno considerado como hipoxia en células musculares esqueléticas.

Como una manera de evaluar si las condiciones de hipoxia utilizadas son adecuadas (1% - 2% O<sub>2</sub>), se analizó por Western blot la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Cabe recordar que la expresión de este factor transcripcional es constitutiva y su degradación es dependiente de la presencia de oxígeno. Para ello los miotubos fueron incubados en medio de reposo al menos 30 minutos, sometidos a hipoxia continua durante períodos de tiempo variables, entre 10 minutos y 90 minutos, realizando Western blot para HIF-1 $\alpha$  (Novus Biologicals) en los lisados. A los 10 minutos de exposición a hipoxia ya se detecta un aumento de HIF-1 $\alpha$  que fue mayor a los 90 minutos. Cabe mencionar que el anticuerpo anti HIF-1 $\alpha$  reconoce varias bandas de forma inespecífica, sin embargo, la banda que corresponde a la subunidad alfa de HIF-1 se ubica alrededor de los 120 KDa de peso molecular como se muestra en la Figura 4.

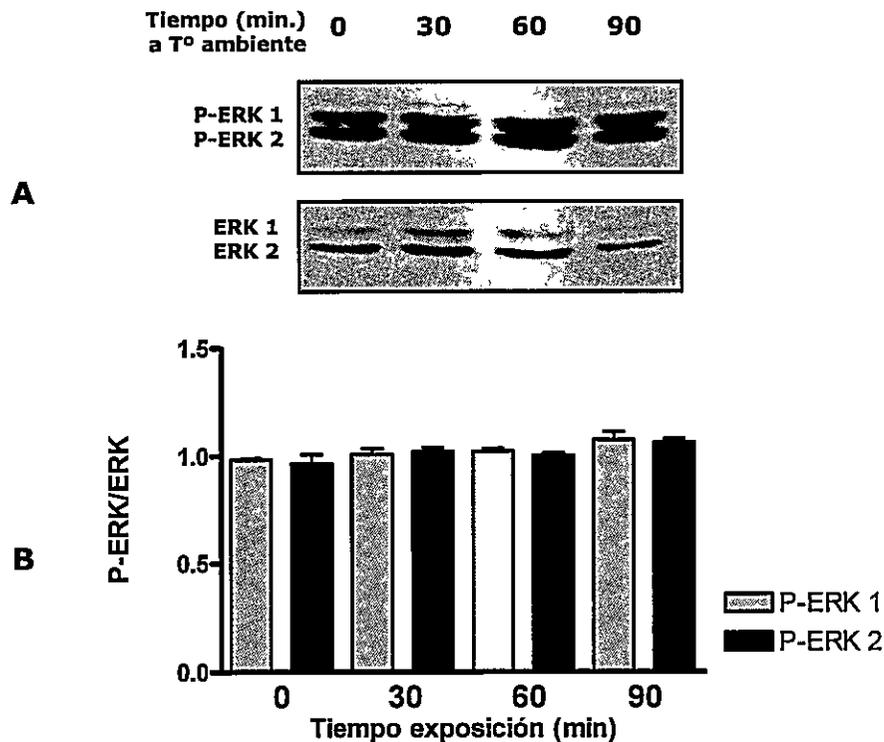
Como control positivo los miotubos fueron expuestos a cloruro de cobalto 100  $\mu$ M por un período de 3 horas detectándose un aumento de HIF-1 $\alpha$  similar a las condiciones experimentales de hipoxia (Figura 4).

Como la exposición a hipoxia fue realizada a temperatura (T $^{\circ}$ ) ambiente por tiempos de hasta 1 hora, y con el fin de determinar si la exposición a T $^{\circ}$  ambiente ejerciera alguna influencia sobre la fosforilación de ERK 1 y ERK 2, se realizaron 2 experimentos controles independientes por duplicado en los cuales las células fueron incubadas a T $^{\circ}$  ambiente por distintos períodos de tiempos llegando hasta un máximo de 90 minutos no encontrándose cambios en los niveles de fosforilación respecto al control incubado a 37 $^{\circ}$  C (Figura 5).



**Figura 4.**

**Hipoxia induce la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .** A. Western Blot de HIF-1 $\alpha$ , utilizando  $\beta$ -actina como control de carga, en miotubos expuestos a hipoxia en tiempos de 10 minutos y hasta 90 minutos. En el último carril de la figura se muestra que HIF-1 $\alpha$  aumenta debido a la exposición de los miotubos a 100  $\mu$ M cloruro de cobalto (un inhibidor de la degradación oxígeno-dependiente de HIF-1 $\alpha$ ) en condiciones de normoxia. B Análisis densitométrico de los resultados obtenidos en un experimento único realizado por duplicado para cada tiempo y condición. Los niveles de HIF-1  $\alpha$  están normalizados respecto del nivel medido en células no estimuladas.

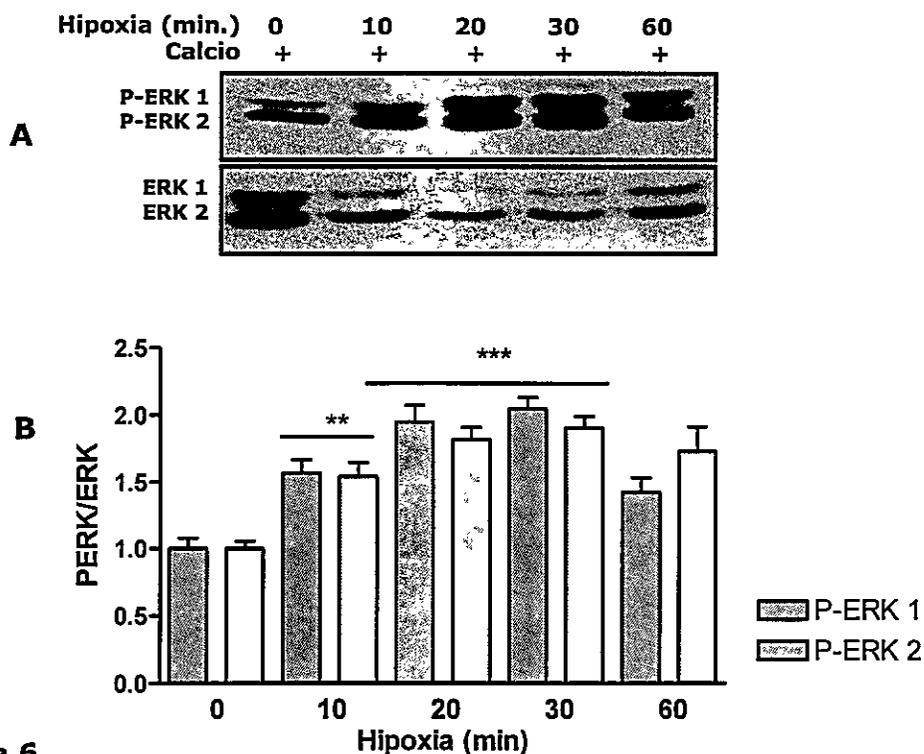


**Figura 5.**

**La exposición de los miotubos a T° ambiente no induce cambios en la fosforilación de ERKs.** A. Western Blots de las formas fosforiladas de ERK1/2 (P-ERK1/2) y de ERK2 de lisados de miotubos expuestos a T° ambiente por períodos de 0 hasta 90 minutos. B Análisis densitométrico de resultados obtenidos de duplicados al menos 2 experimentos independientes. Se calcula la razón P-ERK1 y P-ERK2 sobre ERK totales (el anticuerpo anti-ERK2 reconoce ambas isoformas de manera que se utilizan ambas bandas como control de carga), y estas razones P-ERK/ERK obtenidas a temperatura ambiente a distintos tiempos, son expresadas como fracción respecto del nivel de fosforilación en células incubadas a 37° C. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error standard.

### **Activación de ERKs mediada por hipoxia.**

Los miotubos diferenciados (séptimo día post-plaqueo) fueron incubados en medio de reposo por 30 minutos y posteriormente expuestos a hipoxia continua (1% - 2% O<sub>2</sub>) por tiempos de 10 minutos hasta 3 horas. Los datos mostrados (Figura 6), corresponden a tiempos de hasta 1 hora, ya que no hubo cambios significativos en los niveles de fosforilación después de los 30 minutos de exposición a hipoxia. Los resultados señalan que hipoxia aumenta la fosforilación de ERK 1 y ERK 2 de manera transitoria alcanzando mayor nivel para ambas isoformas de la enzima a los 30 minutos siendo 2.21 y 2,01 veces respectivamente sobre el control sin estimular. A los 60 minutos de exposición a hipoxia existe una caída en los niveles de fosforilación de ambas isoformas, no siendo significativos dichos niveles respecto al control sin hipoxia. A tiempos de 1,5 y 3 hrs de exposición a hipoxia no hubo cambios en los niveles de fosforilación de ERKs (datos no mostrados).

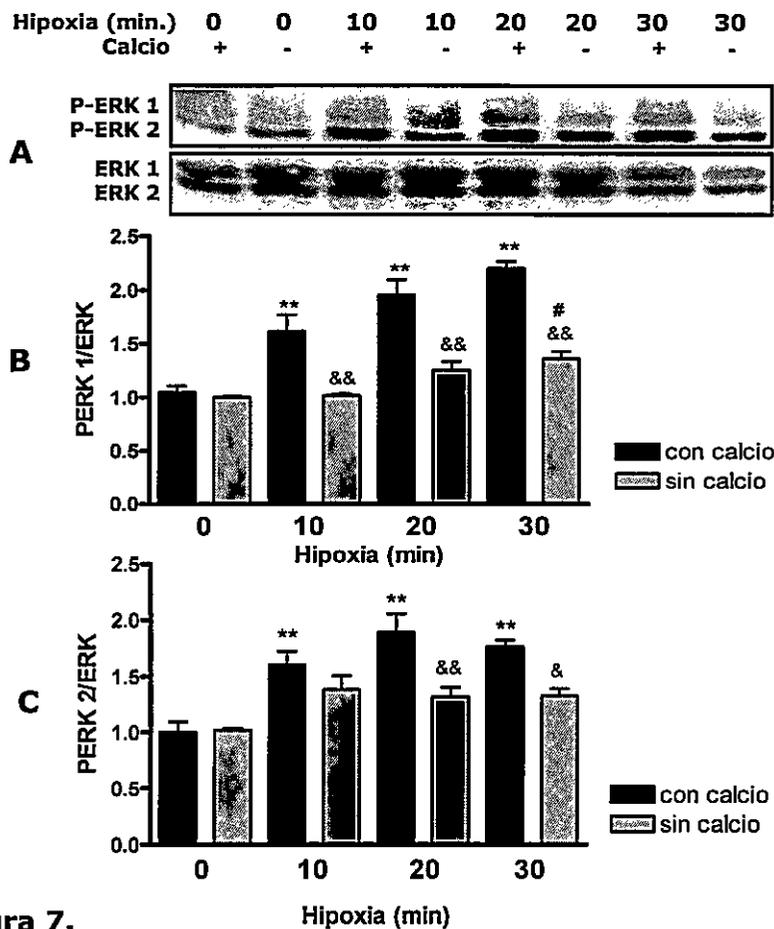


**Figura 6.**

**Aumento de la fosforilación de ERKs inducida por hipoxia.** A. Western Blots de P-ERK1/2 y de ERK2 de lisados de miotubos expuestos a hipoxia por 10 hasta 60 minutos. El anticuerpo anti-ERK2 reconoce ambas isoformas de manera que se utilizan ambas bandas como control de carga. B Análisis densitométrico de resultados obtenidos de duplicados al menos 12 experimentos independientes. La razón P-ERK1/ERK y P-ERK2/ERK obtenidas en los distintos tiempos fueron graficadas como fracción respecto del nivel de fosforilación (P-ERK/ERK) en células no estimuladas. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error standard. \*\* y \*\*\*,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$  respectivamente, determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni.

## **Efecto de la ausencia de calcio externo en la activación de ERKs durante hipoxia.**

Para determinar si el calcio externo participa en el aumento de fosforilación de ERKs inducido por hipoxia, se procedió a incubar los miotubos en medio de reposo sin calcio agregado (la concentración de calcio fue compensada por magnesio) y EGTA 0,5 mM. A partir de los 10 minutos de exposición a hipoxia se encontró una disminución parcial significativa en los niveles de fosforilación en la isoforma ERK1 respecto al control con calcio (Figura. 7). La inhibición significativa en la fosforilación de la isoforma ERK2 ocurrió más tardíamente, a los 20 minutos de exposición a hipoxia.

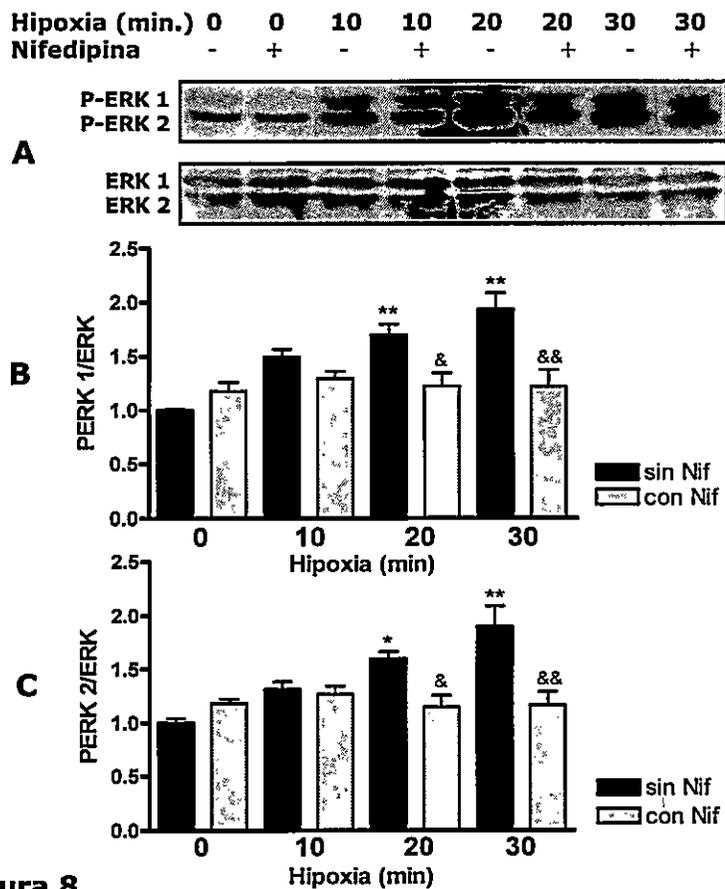


**Figura 7.**

**La fosforilación de ERKs inducida por hipoxia es parcialmente inhibida por ausencia de calcio externo.** A. Western Blot de P-ERK1/2 y ERK2 como control de carga, de lisados totales de miotubos expuestos a hipoxia por 10 a 30 minutos. B y C Análisis densitométrico de Western blots para P- ERK1 y P-ERK2, respectivamente. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error standard de medidas realizadas en duplicado de al menos 5 experimentos independientes. \*, \*\* y \*\*\*,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$  respectivamente, en la condición con calcio externo, respecto al control a tiempo cero (sin hipoxia). & y &&,  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  respectivamente, comparación en cada tiempo entre las condiciones con y sin calcio en el medio externo, determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni.

## **Efecto de nifedipina en la activación de ERKs durante hipoxia.**

Como la activación de la fosforilación de ERKs por hipoxia requiere parcialmente de la presencia de calcio en el medio externo, se evaluó la participación de canales de calcio voltaje-dependientes tipo L. Para ello se incubaron las células previo a hipoxia con medio Krebs con o sin nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), un bloqueador de estos canales, y se indujo hipoxia en presencia y ausencia de nifedipina. Se encontró una disminución significativa respecto al control sin el inhibidor en los niveles de fosforilación en ambas isoformas de ERK a partir de los 20 minutos de exposición a hipoxia (Figura 8).

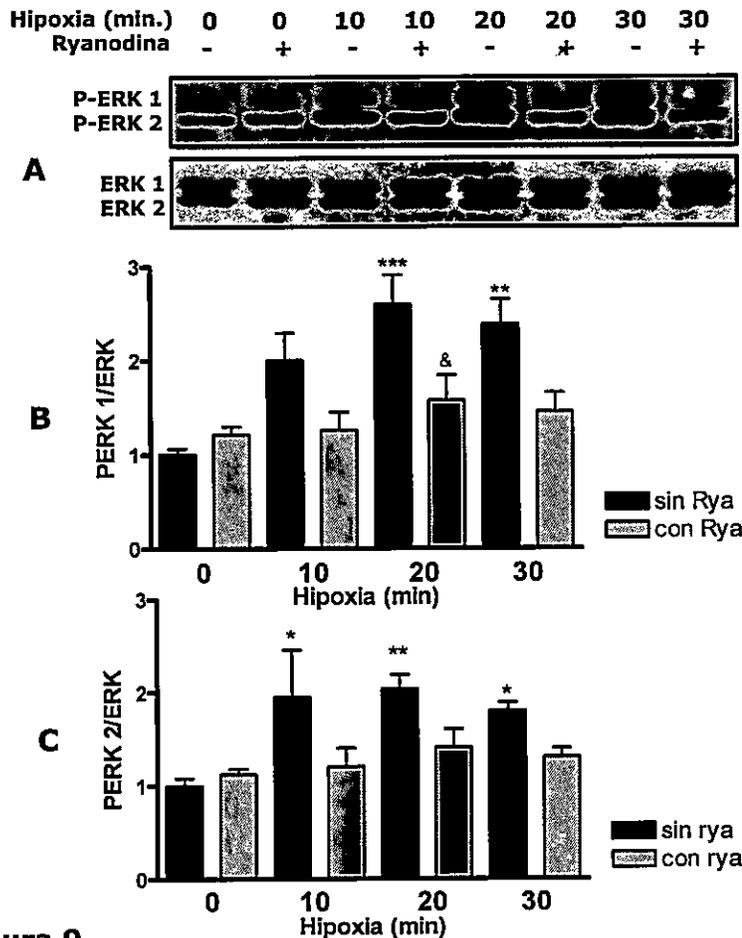


**Figura 8.**

**La fosforilación de ERKs inducida por hipoxia es parcialmente bloqueada por nifedipina.** A. Western Blot de P-ERK1/2 y ERK2 como control de carga, de lisados totales de miotubos expuestos a hipoxia por 10 a 30 minutos. B y C Análisis densitométrico de Western blot para fosforilación de isoforma ERK1 y ERK2, respectivamente, tanto en presencia como en ausencia de nifedipina (10  $\mu$ M). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error standard de medidas realizadas en duplicado en al menos 3 experimentos independientes, normalizadas respecto del nivel en células no estimuladas. \* y \*\*,  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  respectivamente, de la condición sin nifedipina, respecto al control a tiempo cero (sin hipoxia). & y &&,  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  respectivamente, comparación de la condición con nifedipina respecto al control sin el inhibidor, determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni.

### **Efecto de ryanodina en la activación de ERKs durante hipoxia.**

Como en la activación de la fosforilación de ERKs mediada por hipoxia participa parcialmente el calcio proveniente desde el medio extracelular, el cual ingresa a la célula a través de canales tipo L, se evaluó además la participación de calcio proveniente desde depósitos intracelulares. Para ello, células musculares fueron incubadas previamente y durante la exposición a hipoxia con 50  $\mu\text{M}$  de ryanodina, condición que inhibe la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico a través del canal RyR. Se encontró una disminución significativa respecto al control sin el inhibidor farmacológico en los niveles de fosforilación en la isoforma ERK1 sólo en el tiempo de 20 minutos de exposición a hipoxia, en cambio no hubo inhibición significativa en la fosforilación de la isoforma ERK2 en ninguno de los tiempos de exposición a hipoxia (Figura 9).

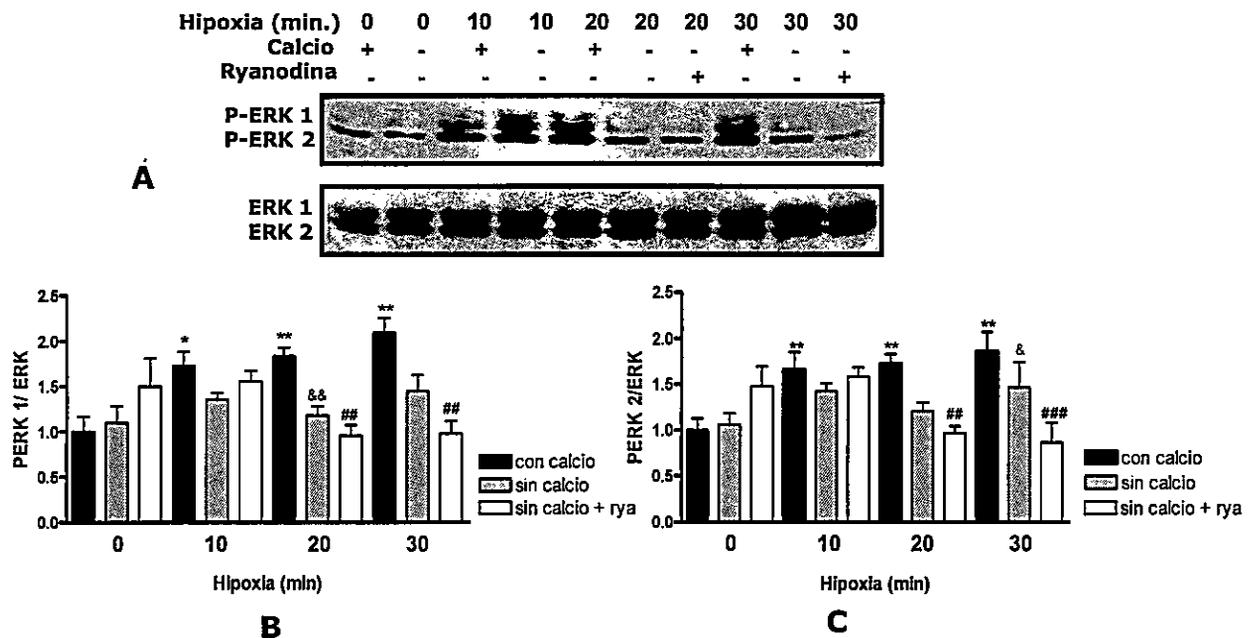


**Figura 9.**

**La fosforilación de ERKs inducida por hipoxia es parcialmente bloqueada por ryanodina.** A. Western Blot de P-ERK1/2 y ERK2 de lisados totales de miotubos expuestos a hipoxia en tiempos de 10 hasta 30 minutos. B y C Análisis densitométrico de Western blot para fosforilación de isoforma ERK1 y ERK2 respectivamente, tanto en presencia como en ausencia de ryanodina (50  $\mu$ M). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error standard de medidas realizadas en duplicado en al menos 3 experimentos independientes, normalizadas respecto del nivel en células no estimuladas. \* y \*\*,  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  respectivamente, de la condición control sin ryanodina respecto de su control sin estimular. &,  $P < 0.01$  respectivamente, comparación de la condición con ryanodina respecto al control sin el inhibidor, determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni.

### **Efecto de ausencia de calcio externo y presencia de ryanodina en la activación de ERKs durante hipoxia.**

Los resultados previos muestran una participación tanto de calcio proveniente desde el medio extracelular como desde depósitos internos dependientes de RyR, en la activación de la fosforilación de ERKs en condiciones de hipoxia, siendo mayor la participación del calcio proveniente desde el exterior de la célula. Se evaluó la combinación de ambas condiciones sobre la fosforilación de ERKs en células musculares sometidas a hipoxia en presencia de 50  $\mu$ M de ryanodina y en ausencia de calcio en el medio externo. Se encontró una disminución total respecto al control con calcio, en los niveles de fosforilación para ambas isoformas de ERK a partir de los 20 minutos de exposición a hipoxia (Figura 10).



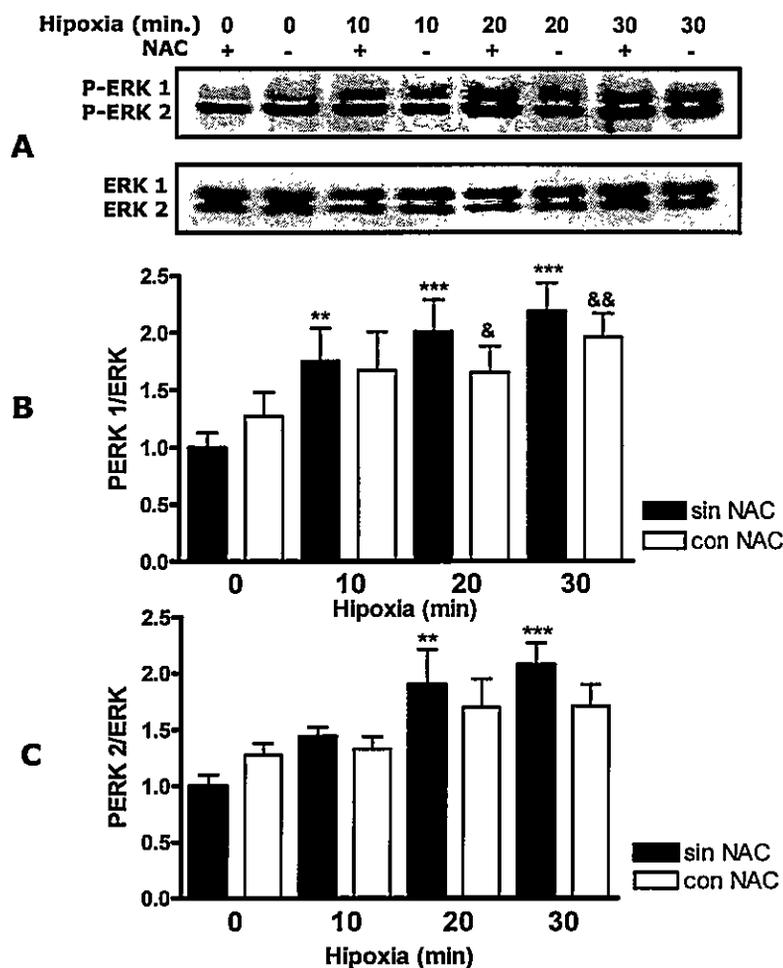
**Figura 10.**

**La fosforilación de ERKs inducida por hipoxia es completamente bloqueada por ausencia de calcio externo e inhibición del RyR.** A.

Se muestra un análisis mediante Western Blot de P-ERK1/2 y ERK2 de lisados totales de miotubos expuestos a hipoxia en tiempos de 10 hasta 30 minutos en las siguientes condiciones: presencia de calcio, ausencia de calcio extracelular, ausencia de calcio extracelular y presencia de ryanodina en concentración inhibitoria del RYR. B y C Análisis densitométrico de Western blot para la fosforilación de las isoformas ERK1 y ERK2 respectivamente, en las condiciones señaladas previamente. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error standard de medidas realizadas en duplicado en al menos 3 experimentos independientes, normalizadas respecto del nivel de fosforilación en células no estimuladas incubadas en medio con calcio externo. \* y \*\*,  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  respectivamente, de la condición con calcio externo y sin ryanodina, respecto de su control sin hipoxia. &,  $P < 0.01$  respectivamente, comparación de la condición sin calcio respecto a la condición con calcio externo y sin ryanodina. ## y ###,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$  respectivamente, comparación de la condición sin calcio con ryanodina respecto a la condición con calcio externo sin ryanodina determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni.

## **Efecto de N-Acetilcisteína en la activación de ERKs durante hipoxia.**

Recientemente se ha descrito que durante la exposición a hipoxia se detecta la formación de ROS en músculo de diafragma (Zuo y Clanton 2005). Para evaluar la participación de ROS en la activación de la fosforilación de ERKs, las células musculares fueron incubadas previamente y durante la estimulación hipóxica con 15 mM de N-Acetilcisteína (NAC) un atrapador de ROS. Se encontró una disminución significativa respecto al control, sin el inhibidor farmacológico, en los niveles de fosforilación en la isoforma ERK1 a partir de los 20 minutos de exposición a hipoxia, en cambio no hubo inhibición significativa en la fosforilación de la isoforma ERK2 en ninguno de los tiempos de exposición a hipoxia (Figura 11).



**Figura 11.**

**La fosforilación de ERKs inducida por hipoxia es parcialmente bloqueada por N-Acetilcisteína (NAC).** A. Western Blot de P-ERK1/2 y ERK2 de lisados totales de miotubos expuestos a hipoxia en tiempos de 10 hasta 30 minutos en presencia o ausencia de NAC 15 mM. B y C Análisis densitométrico de Western blot para fosforilación de isoforma ERK1 y ERK2 respectivamente, tanto en presencia como en ausencia del atrapador de ROS. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error Standard de medidas realizadas en duplicado en al menos 3 experimentos independientes, normalizadas respecto del nivel en células no estimuladas. \*\* y \*\*\*,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$  respectivamente, de la condición control sin NAC respecto de su control. & y &&,  $P < 0.01$  y  $p < 0.01$  respectivamente, comparación de la condición con NAC, respecto al control sin el inhibidor, determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni.

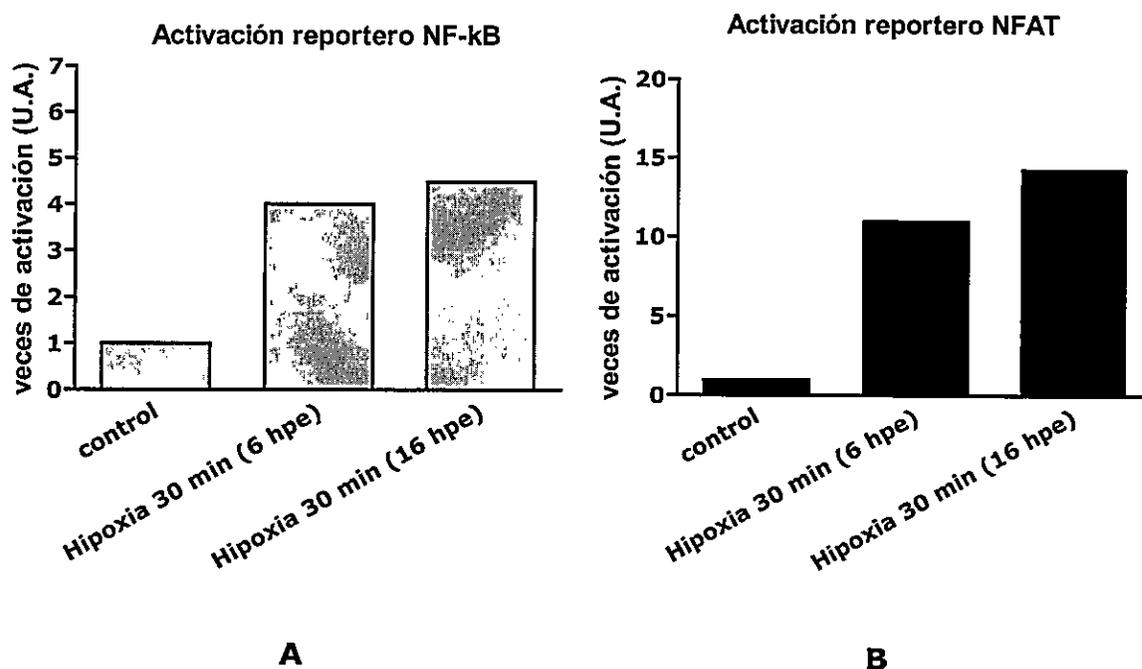
## **Activación de la transcripción mediada por NF-κB y NFAT inducida por hipoxia en cultivo primario de miotubos.**

Para analizar la transcripción mediada por elementos de respuesta a NF-κB se utilizó el vector reportero NF-κB 6X el cual contiene 6 cajas consenso de unión de NF-κB río arriba del promotor para pGL3. Por otra parte, para analizar la transcripción mediada por elementos de respuesta a NFAT se utilizó el vector reportero NFAT 15X en el cual se encuentra el promotor para el gen MCIP1 que contiene 15 cajas de unión para NFAT.

Los miotubos diferenciados (séptimo día post-plaqueo) fueron incubados en medio de reposo al menos 30 minutos y posteriormente sometidos a hipoxia por un tiempo de 30 minutos las células fueron lisadas 6 y 16 horas post-estímulo y se determinó su actividad *Firefly* y *Renilla* luciferasa. Los datos corresponden al promedio de medidas realizadas en duplicado en 2 experimentos independientes, expresadas como las fracciones del nivel normalizado en células no estimuladas.

Los resultados señalan que la exposición a hipoxia durante 30 minutos activa la transcripción dependiente de NF-κB 4 veces sobre el control sin estimular. (Figura 12A). Respecto a la transcripción dependiente de NFAT los resultados señalan que 30 minutos de exposición a hipoxia activa entre 11 y 15 veces al

reportero NFAT 15X sobre la condición control sin estimular (Figura 12B).



**Figura 12.**

**Activación de vector reportero para NF-kB y NFAT inducida por hipoxia en cultivo primario de miotubos.** A. Cultivos primarios de miotubos fueron co-transfectados con el vector reportero NF-kB 6Xy pRL-TK. Los miotubos diferenciados fueron sometidos a hipoxia por un período de 30 minutos. Las células fueron lisadas 6 y 16 horas post estímulo (hpe) y determinada su actividad Firefly y *Renilla* luciferasa. B. Cultivos primarios de miotubos fueron co-transfectados con el vector reportero NFAT 15X y pRL-TK. Los miotubos diferenciados fueron sometidos a hipoxia por un período de 30 minutos. Las células fueron lisadas a 6 y 16 horas post estímulo (hpe) y determinada su actividad Firefly y *Renilla* luciferasa.

Los datos corresponden al promedio de medidas realizadas en duplicado en 2 experimentos independientes, expresadas como las fracciones del nivel normalizado en células no estimuladas.

## DISCUSIÓN

La homeostasis del oxígeno en células y tejidos de mamíferos es regulada de manera estricta, siendo necesario mantener niveles críticos para sustentar procesos dependientes de oxígeno como la producción de energía, manteniendo así el funcionamiento normal de la célula y asegurando la sobrevivencia celular, pues la producción excesiva de ROS causa daño oxidativo que afecta tanto al DNA como a lípidos y proteínas que son esenciales para la normal función celular (Bracken y col., 2003; Seta y col., 2002). En un estado de hipoxia, la demanda de oxígeno excede su suministro o disponibilidad, lo que genera tensiones de oxígeno tisulares más bajas que los niveles fisiológicos normales (Bracken y col., 2003; Hopfl y col., 2004). Los estados de hipoxia sostenidos pueden conducir a la muerte celular, de manera que las células han desarrollado sofisticados mecanismos de adaptación frente a la hipoxia. Entre ellos, reviste gran importancia la capacidad de la célula o del tejido en particular de detectar la disminución del oxígeno ambiental, para luego responder frente a esta señal asegurando un aumento en el suministro de oxígeno (Hoppeler y Vogt, 2001a; Laderoute y col., 2002; Seta y col., 2002; Bracken y col. 2003; Hopfl y col., 2004).

### ***Efectos de hipoxia sobre ERK en músculo esquelético:***

Es importante señalar que en el músculo esquelético, en particular, en condiciones de ejercicio físico la concentración de oxígeno tisular es baja y se acerca a una condición de hipoxia. El músculo esquelético responde al ejercicio y a estímulos como la hipoxia y el estrés térmico, con cambios adaptativos que involucran cambios en la expresión de genes. Si bien las vías moleculares que median estas adaptaciones no han sido enteramente dilucidadas, numerosos estudios demuestran que el calcio intracelular participa en la activación de cascadas de señalización que relacionan la actividad muscular con cambios de la expresión génica.

El objetivo central de esta tesis fue determinar si la hipoxia conduce a la activación de la vía ERK, como sucede en otros sistemas celulares (Mottet y col., 2002; Salnikow y col., 2002; Seta y col., 2002; Seta y Millhorn 2004), y si esta activación es dependiente de calcio. Para ello, primero se determinó la expresión del factor de transcripción HIF-1 como control de la condición experimental de hipoxia utilizada. En este marco, se pudo determinar que HIF-1 está presente en células musculares en cultivo primario en condiciones de normoxia (Figura 4), y que rápidamente incrementan sus niveles en las condiciones de hipoxia utilizadas, llegando a alcanzar niveles hasta 5 veces mayores que

los del control normóxico.

En otros tejidos se ha descrito que la hipoxia activa MAP quinasas como ERKs y SAPKs, además de varias otras vías de señalización intracelular entre las cuales se encuentran las quinasas PKA, CaMK y PI3K/Akt (Seta y Millhorn, 2004). Los resultados de nuestro estudio muestran que a partir de los 10 minutos de exposición de los miotubos a hipoxia se produce un aumento transitorio de la fosforilación de ERK1 y ERK2. Este aumento fue aun mayor entre los 20 y 30 minutos, disminuyendo a valores basales a tiempos de 1 a 3 horas de exposición continua a hipoxia.

***Papel del calcio en la estimulación de ERK por hipoxia:*** En esta tesis mostramos, además, que en miocitos el aumento de la fosforilación de ERKs inducido por hipoxia depende de calcio. En este mismo modelo celular se ha descrito que el aumento de la fosforilación de ERKs inducida por despolarización con alto potasio externo también es dependiente de calcio (Carrasco y col., 2003). Uno de los mecanismos posibles a través de los cuales el calcio estimula la vía ERK es mediante la activación de Ras, una proteína G pequeña unida a GTP (Roux y Blenis, 2004; Thomas y Huganir, 2004), que se activa por reclutamiento de GEFs (guanyl nucleotide exchange factors). Estos factores, que forman una familia de varios miembros algunos de los cuales son dependientes de calcio

(Kennedy y col., 2005), estimulan el intercambio de GDP a GTP, permitiendo la interacción de Ras con un amplio rango de proteínas río abajo. Entre ellas se encuentra la proteína Raf, una serina/treonina quinasa (Roux y Blenis 2004; Thomas y Huganir 2004) que fosforila a MEK1 y MEK2, las que a su vez fosforilan a ERK1 y ERK2 en un motivo altamente conservado (Tre-Glu-Tir) en su lazo de activación (Roux y Blenis 2004). La activación por fosforilación de ERK1/2 induce su translocación al núcleo, donde fosforila varios sustratos, tales como los factores transcripcionales c-jun, c-myc y Elk-1 (Minet y col., 2000).

Las propiedades de las señales de calcio, como su amplitud, su frecuencia si es oscilatoria o su ubicación subcelular, o la vía de entrada de calcio, regulan la especificidad de las respuestas celulares (Carrasco y col., 2004; Berridge y col., 2003; Dolmetsch, 2003; Sakamoto y Goodyear, 2002). Por lo tanto, investigamos el origen del calcio que induce la activación de ERKs por hipoxia para caracterizar en mayor detalle su participación en esta respuesta. Encontramos que tanto el calcio proveniente desde el medio extracelular como el calcio liberado desde depósitos intracelulares vía RyR contribuyen a estimular ERK1/2 en hipoxia. Estos resultados fueron obtenidos ya sea omitiendo calcio del medio externo y/o utilizando ryanodina como inhibidor del RyR (en esta tesis no se realizaron mediciones de señales de calcio).

Durante la fase aguda de la respuesta hipóxica en varios tipos celulares, tales como músculo liso pulmonar, células tipo I del cuerpo carotídeo y células PC12, se ha visto un aumento en la concentración de calcio intracelular que se origina principalmente por el calcio extracelular (Seta y col., 2004). Las células PC12 sometidas a hipoxia exhiben una rápida respuesta que se caracteriza por una despolarización de su membrana y por la generación de aumentos transitorios de calcio intracelular; la despolarización se produce por la inhibición de canales de potasio sensibles a oxígeno (Kv 1.2), lo que conduce a su vez a una entrada de calcio como consecuencia de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (Seta y col., 2004). El incremento del calcio intracelular inducido por hipoxia en células tipo I del cuerpo carotídeo y en células PC12 es inhibido por bloqueo farmacológico de canales de calcio voltaje dependientes (Seta y col., 2004). Asimismo, los resultados de esta tesis indican que el calcio ingresa desde el medio externo al interior de la célula muscular a través de canales de calcio tipo L, pues al utilizar nifedipina (un inhibidor farmacológico de los canales de calcio tipo L) la fosforilación de ERK1/2 disminuyó significativamente.

En células endoteliales y neuronas se ha descrito que el calcio proveniente desde depósitos intracelulares, liberado vía RyR, contribuye en forma significativa al aumento del calcio intracelular

que se observa después de dos horas de exposición a hipoxia (Salnikow y col., 2002). Nuestros resultados, que muestran una inhibición significativa por ryanodina, también indican que el calcio liberado vía RyR contribuye a la activación de ERK1/2 inducida por hipoxia. Sin embargo, los efectos inhibitorios de la ausencia de calcio externo o de nifedipina o ryanodina sobre la estimulación de la fosforilación de ERKs inducida por hipoxia fueron siempre de carácter parcial, lo que contrasta con la inhibición total que produjo la ryanodina en ausencia de calcio externo (Figura 10). Sobre la base de estos resultados, proponemos que la estimulación de la fosforilación de ERK por hipoxia en células de músculo esquelético es totalmente dependiente de calcio.

***La estimulación de ERK por hipoxia involucra ROS:*** En este trabajo de tesis se ha demostrado, además, que el aumento de la fosforilación de ERK1 inducida por hipoxia fue inhibida parcialmente por NAC (un agente reductor). Respecto de ERK2, se obtuvo solamente una tendencia a la disminución de la fosforilación que no resultó significativa. El interés en determinar la posible contribución de ROS en la fosforilación de ERKs proviene de considerar varios antecedentes. Por un lado, el músculo esquelético genera ROS en respuesta a hipoxia (Zuo y Clanton 2005), aunque como se ha señalado, existe bastante controversia a este respecto.

Las diferentes vías de formación de ROS están presentes en músculo esquelético. La generación de anión superóxido, el primer evento en la cadena de síntesis de ROS, puede ser mediada por enzimas como la NADPH oxidasa (NOX) y la xantina oxidasa, o en forma no enzimática por compuestos tales como la semi-ubiquinona de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Droge 2002). Se ha descrito la presencia de NOX en homogeneizados de células musculares esqueléticas (Javeshgani y col., 2002), y específicamente en túbulos transversales y fracciones de membranas de túbulos transversales aisladas de músculo esquelético, pero no en retículo sarcoplásmico (RS) (Hidalgo y col., 2005). Es importante señalar, además, que los RyR son altamente susceptibles a modificaciones redox y que el estado redox del canal controla a su vez su actividad (Hidalgo y col., 2002) y modifica el flujo de calcio desde el RS hacia el citoplasma (Anzai y col., 2000; Donoso y col., 2000; Hidalgo y col., 2002; Pessah y Feng, 2000; Pessah y col., 2002). Cada subunidad de RyR1 (el principal homotetrámero del músculo esquelético) posee 100 residuos de cisteína, de los cuales 12 son altamente reactivos y susceptibles de ser modificados por oxidación, nitrosilación o alquilación (Aracena-Parks y col., 2006; Donoso y col. 2000; Dulhunty y col., 2000; Feng y Pessah, 2002; Hidalgo y col., 2004; Hidalgo y col., 2005; Meissner, 2002; Meissner, 2004; Pessah y

Feng, 2000; Xu y col., 1998). Las cisteínas altamente reactivas presentan un pK de 7.4, lo que permite modificaciones redox del canal a pH fisiológico (Hidalgo y col., 2004; Pessah y col., 2002). Basándose en esta propiedad, se ha postulado que los RyR actúan como sensores del ambiente redox intracelular (Feng y Pessah, 2002; Hidalgo y col., 2005; Pessah y col., 2002). Entre las especies redox endógenas que pueden modificar los RyR se ha descrito al oxígeno (Eu y col., 2000), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Favero y col., 1995; Oba y col., 2000), óxido nítrico y dadores de óxido nítrico (Eu y col., 2003; Meissner, 2002; Meissner, 2004; Suko y col., 1999; Sun y col., 2001a; Sun y col., 2001b; Sun y col., 2003; Salama y col., 2000).

En apoyo a una activación de RyR por ROS, en el laboratorio se ha descrito recientemente que la exposición de miotubos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un ROS derivado del anión superóxido, induce la activación de una cascada de señalización dependiente del calcio liberado vía RyR, que involucra a ERK, CREB y la expresión de los genes inmediatos tempranos c-fos y c-jun (Espinosa y col., 2006). Por lo tanto, si la hipoxia contribuye a generar ROS en músculo esquelético, es posible que los ROS generados activen la liberación de calcio mediada por RyR.

### ***Estimulación de factores de transcripción por hipoxia:***

Los factores de transcripción NFAT y NF- $\kappa$ B tienen una participación importante en eventos de respuesta frente a diversos estímulos que implican cambios transitorios en las concentraciones intracelulares de calcio (Crabtree y Olson 2002; Hogan y col., 2003; Dolmetsch y col., 1998). En experimentos preliminares se determinó en esta tesis que al exponer a hipoxia el cultivo primario de miotubos por 30 minutos se activó la transcripción dependiente de NFAT y NF- $\kappa$ B. Por lo tanto, se resumen brevemente a continuación algunas sus características.

*NFAT*: La familia de factores de transcripción NFAT está compuesta por cinco proteínas (NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 y NFAT5), que en estado de reposo permanecen fosforiladas en el citoplasma y que están evolutivamente relacionadas con la familia Rel/ NF- $\kappa$ B. La estimulación de calcineurina (una fosfatasa dependiente de calcio-calmodulina) induce la desfosforilación de varios residuos de fosfo-serina presentes en NFATc, lo que promueve la exposición de una secuencia de localización nuclear (NLS) que induce su rápida translocación al núcleo (Tomida y col., 2003; Crabtree y Olson, 2002; Hogan y col., 2003). Existen varios trabajos que describen la activación de NFATc1 en células de músculo esquelético por diversos estímulos, incluida la despolarización (Glass, 2003; Liu y col., 2001; Kubis y col., 2003;

Rosenberg y col., 2004; Stiber y col., 2005). También se ha asociado al complejo calcineurina-NFAT con procesos de proliferación, diferenciación y fusión de miotubos; por su parte, la isoforma NFATc1 se ha asociado con procesos que llevan tanto a la hipertrofia de músculo esquelético como a la remodelación y regulación de genes específicos de fibras musculares lentas (Abbott y col., 1998; Chin y col., 1998; Delling y col., 2000; Allen y Leinwand, 2002; Kubis y col., 2003; Liu y cols., 2001; McCullagh y col., 2004; Schiaffino y Serrano, 2002; Olson y Williams, 2000). Al igual que en el caso de NF- $\kappa$ B, la despolarización de miotubos por alto  $K^+$  externo o por estimulación eléctrica produce aumentos intracelulares de calcio, que proviene de depósitos intracelulares vía RyR y del medio externo, que activan NFAT (Valdés y col., 2007).

*NF- $\kappa$ B*: El factor de transcripción NF- $\kappa$ B está normalmente unido a una proteína inhibitoria (I $\kappa$ B), cuya fosforilación es señal de degradación. Por lo tanto, el mecanismo clásico de activación de NF- $\kappa$ B reside en la fosforilación y posterior degradación de I $\kappa$ B, lo que permite que I $\kappa$ B se libere y se mueva al núcleo donde ejerce su función efectora (Ghosh y Karin, 2002; Lilienbaum e Israel, 2003; Tian y Brasier, 2003). El calcio participa tanto en los mecanismos que conducen a la degradación de I $\kappa$ B como en la transactivación de algunas isoformas de NF- $\kappa$ B en el núcleo.

En músculo esquelético se ha reportado que el factor de transcripción NF- $\kappa$ B está involucrado en los procesos de proliferación y diferenciación del miotubo, y se ha descrito también que en músculo adulto el ejercicio físico, la contracción *in vitro* y el desgaste muscular contribuyen a la activación de NF- $\kappa$ B. Se ha propuesto, además, que NF- $\kappa$ B podría jugar un papel en la regeneración muscular después de un daño producido por el ejercicio intenso (Cai y col., 2004; Ji y col., 2004; Ho y col., 2005; Kumar y Boriek, 2003; Jackman y Kandarian, 2004; Hunter y col., 2002). Asimismo, se ha descrito que se activa NF- $\kappa$ B a través de la vía calcio-calcineurina en células musculares sometidas a un estrés mitocondrial que produce niveles altos y sostenidos de calcio citoplasmático (Biswas y col., 2003).

En nuestro laboratorio, se ha demostrado que la despolarización del músculo esquelético inducida por alto  $K^+$  externo (despolarización crónica) o por estimulación eléctrica (despolarización fluctuante) activa NF- $\kappa$ B por la vía clásica de degradación de I $\kappa$ B, que se activa por calcio liberado de depósitos intracelulares vía RyR e IP3R y sin participación de calcio externo (Valdés y col., 2007). Entre las vías de señalización que participan en esta activación se encuentran la calcineurina y PKCs, además de ROS. Es importante señalar en este contexto que NF- $\kappa$ B es considerado un factor de transcripción clásicamente activado por

ROS (Carrasco e Hidalgo, 2006; Valdés y col., 2007).

***Estimulación de otros factores transcripcionales por hipoxia:*** Como se ha indicado previamente, en células musculares esqueléticas la despolarización por alto  $K^+$  estimula la fosforilación de ERK1/2, la que al estimular la fosforilación de CREB conduce a un aumento de los niveles de los mRNA de los genes tempranos c-fos, c-jun y egr-1 (Carrasco y col., 2003). Sin embargo, no se ha descrito en la literatura si la hipoxia estimula la fosforilación de CREB y la expresión de genes CREB-dependientes en estas células. Se sabe, sin embargo, que en células PC12 la hipoxia induce (por una vía desconocida) la fosforilación de CREB en serina 133, una modificación que es esencial para su activación (Seta y Millhorn, 2004) la estimulación de CREB por hipoxia es mayor que su estimulación por forskolina o despolarización con  $K^+$ , pero no se ha reportado si esta mayor estimulación tiene algún significado funcional. En células PC-12 también se conoce que la hipoxia activa c-fos a través de CaMKII, y que esta quinasa induce la fosforilación de CREB en serina 133; mutaciones puntuales en la caja Ca/CRE atenuan la activación transcripcional de c-fos por hipoxia, en tanto que mutaciones puntuales en la caja SRE la suprimen completamente (Premkumar y col., 2000).

En células HEK-293 y A549 en condiciones de hipoxia, el aumento de calcio intracelular induce la transcripción de genes tempranos dependientes de AP-1, un factor de transcripción formado por homodímeros o heterodímeros de fos y jun (Salnikow y col., 2002). Dentro de los genes regulados a lo menos parcialmente por AP-1 se incluye la tirosina hidroxilasa y eNOS. El mecanismo por el cual la hipoxia activa AP-1 no ha sido completamente elucidado (Cummins y Taylor, 2005), aunque parece involucrar la vía JNK, al menos en parte. Otro posible mecanismo de inducción de AP-1 es vía un aumento de calcio intracelular independiente de HIF-1 (Cummins y Taylor 2005). No hay información, sin embargo, sobre hipoxia y AP-1 en músculo esquelético.

## **CONCLUSIONES**

1. La hipoxia aumenta en forma transitoria la fosforilación de ERK1/2 en células musculares de rata.
2. El aumento en la fosforilación de ERK1/2 por hipoxia depende tanto de la entrada de calcio a la célula muscular a través de canales de calcio tipo L como de la liberación de calcio de depósitos intracelulares vía RyR.
3. La N-acetilcisteína inhibe parcialmente la fosforilación de ERKs, sugiriendo la participación de ROS en dicha activación
4. La hipoxia induce la activación de la transcripción dependiente de NFAT y NF- $\kappa$ B.

## PROYECCIONES

Dados los resultados preliminares obtenidos en esta tesis, que muestran una activación importante por hipoxia de la transcripción mediada por NFAT y NF- $\kappa$ B, y la participación de calcio en la activación de ERKs, se hace necesario estudiar la contribución de diferentes fuentes de calcio en la activación de ambos factores transcripcionales frente a hipoxia. También, es interesante estudiar la participación de ROS y de la vía de señalización de ERKs en la activación de NFAT y NF- $\kappa$ B por hipoxia. Sin duda, es importante para completar este estudio caracterizar en células musculares esqueléticas sometidas a hipoxia las señales de calcio involucradas, así como la formación de ROS.

Considerando que este estudio es uno de los primeros que aborda los mecanismos de señalización intracelular mediados por hipoxia en músculo esquelético, es necesario como se mencionó previamente profundizar en dichos eventos. Sin embargo, es interesante abordar los mecanismos adaptativos frente a hipoxia en fibras musculares de animales adultos, a fin de tener evidencia y nuevas herramientas para el diseño de metodologías de entrenamiento físico en cámaras de hipoxia

hipobárica con seres humanos que trabajan o viven temporalmente en altura (exposición intermitente a hipoxia), tales como, mineros o personal de las fuerzas armadas, con el objeto de mejorar el rendimiento de este tipo de personal en el desempeño de sus tareas laborales, significando no sólo una ventaja en términos de productividad sino que además una disminución de los riesgos propios de la exposición a la altura y que guardan relación con los trastornos propios de una entidad conocida como enfermedad o mal de altura.

## BIBLIOGRAFÍA

**Abbott, K. L., Friday, B. B., Thaloor, D., Murphy, T. J. y Pavlath, G. K.** (1998). Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NFAT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2905-16.

**Adhikary, G., Premkumar, D. R. y Prabhakar, N. R.** (2000). Dual influence of nitric oxide on gene regulation during hypoxia. *Adv Exp Med Biol* **475**, 285-92.

**Allen, D. L. y Leinwand, L. A.** (2002). Intracellular calcium and myosin isoform transitions. Calcineurin and calcium-calmodulin kinase pathways regulate preferential activation of the IIa myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem* **277**, 45323-30.

**Anzai, K., Ogawa, K., Ozawa, T. y Yamamoto, H.** (2000). Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antioxid Redox Signal* **2**, 35-40.

**Aracena-Parks, P., Goonasekera, S. A., Gilman, C. P., Dirksen, R. T., Hidalgo, C. y Hamilton, S. L.** (2006). Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to disulfides in ryanodine receptor type 1. *J Biol Chem* **281**, 40354-68.

**Berridge, M. J., Bootman, M. D. y Roderick, H. L.** (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-29.

**Berridge, M. J., Lipp, P. y Bootman, M. D.** (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.

**Biswas, G., Anandatheerthavarada, H. K., Zaidi, M. y Avadhani, N. G.** (2003). Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NFkB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of I $\kappa$ B $\beta$ . *J Cell Biol* **161**, 507-19.

**Bootman, M. D., Berridge, M. J. y Roderick, H. L.** (2002). Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol* **12**, R563-5.

**Bracken, C. P., Whitelaw, M. L. y Peet, D. J.** (2003). The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1376-93.

**Bruick, R. K. y McKnight, S. L.** (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337-40.

**Bultynck, G., Szlufcik, K., Kasri, N. N., Assefa, Z., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J. B. y De Smedt, H.** (2004). Thimerosal stimulates Ca<sup>2+</sup> flux through inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1, but not type 3, via modulation of an isoform-specific Ca<sup>2+</sup>-dependent intramolecular interaction. *Biochem J* **381**, 87-96.

**Cai, D., Frantz, J. D., Tawa, N. E., Jr., Melendez, P. A., Oh, B. C., Lidov, H. G., Hasselgren, P. O., Frontera, W. R., Lee, J., Glass, D. J. et al.** (2004). IKK $\beta$ /NF-kB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **119**, 285-98.

**Carafoli, E.** (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1115-22.

**Carrasco, M. A. y Hidalgo, C.** (2006). Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells. *Cell Calcium* **40**, 575-83.

**Carrasco, M. A., Jaimovich, E., Kemmerling, U. y Hidalgo, C.** (2004). Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells. *Biol Res* **37**, 701-12.

**Carrasco, M. A., Riveros, N., Rios, J., Muller, M., Torres, F., Pineda, J., Lantadilla, S. y Jaimovich, E.** (2003). Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1438-47.

**Cowan, K. J. y Storey, K. B.** (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* **206**, 1107-15.

**Crabtree, G. R. y Olson, E. N.** (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-79.

**Cummins, E. P. y Taylor, C. T.** (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* **450**, 363-71.

**Chiarugi, P. y Cirri, P.** (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci* **28**, 509-14.

**Chin, E. R., Olson, E. N., Richardson, J. A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J. M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R. y Williams, R. S.** (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* **12**, 2499-509.

**Davis, T. L., Kwong, K. K., Weisskoff, R. M. y Rosen, B. R.** (1998). Calibrated functional MRI: mapping the dynamics of oxidative metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1834-9.

**Delling, U., Tureckova, J., Lim, H. W., De Windt, L. J., Rotwein, P. y Molkenstin, J. D.** (2000). A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol Cell Biol* **20**, 6600-11.

**Dolmetsch, R.** (2003). Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus. *Sci STKE* **2003**, PE4.

**Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C. y Healy, J. I.** (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-8.

**Dolmetsch, R. E., Xu, K. y Lewis, R. S.** (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**, 933-6.

**Donoso, P., Aracena, P. e Hidalgo, C.** (2000). Sulfhydryl oxidation overrides Mg<sup>2+</sup> inhibition of calcium-induced calcium release in skeletal muscle triads. *Biophys J* **79**, 279-86.

**Dröge, W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.

**Dulhunty, A., Haarmann, C., Green, D. y Hart, J.** (2000). How many cysteine residues regulate ryanodine receptor channel activity? *Antioxid Redox Signal* **2**, 27-34.

**Espinosa, A., Leiva, A., Pena, M., Muller, M., Debandi, A., Hidalgo, C., Carrasco, M. A. y Jaimovich, E.** (2006). Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited  $Ca^{2+}$  stimulates ERK, CREB, early genes. *J Cell Physiol* **209**, 379-88.

**Eu, J. P., Hare, J. M., Hess, D. T., Skaf, M., Sun, J., Cardenas-Navina, I., Sun, Q. A., Dewhirst, M., Meissner, G. y Stamler, J. S.** (2003). Concerted regulation of skeletal muscle contractility by oxygen tension and endogenous nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15229-34.

**Eu, J. P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J. S. y Meissner, G.** (2000). The skeletal muscle calcium release channel: coupled  $O_2$  sensor and NO signaling functions. *Cell* **102**, 499-509.

**Favero, T. G., Zable, A. C. y Abramson, J. J.** (1995). Hydrogen peroxide stimulates the  $Ca^{2+}$  release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **270**, 25557-63.

**Feng, W. y Pessah, I. N.** (2002). Detection of redox sensor of ryanodine receptor complexes. *Methods Enzymol* **353**, 240-53.

**Fill, M. y Copello, J. A.** (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* **82**, 893-922.

**Fluck, M. y Hoppeler, H.** (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **146**, 159-216.

**Ghosh, S. y Karin, M.** (2002). Missing pieces in the NF-kB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81-96.

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

**Greenberg, H., Ye, X., Wilson, D., Htoo, A. K., Hendersen, T. y Liu, S. F.** (2006). Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 591-6.

**Hartee, E.F.** (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-27.

**Hidalgo, C., Aracena, P., Sanchez, G. y Donoso, P.** (2002). Redox regulation of calcium release in skeletal and cardiac muscle. *Biol Res* **35**, 183-93.

**Hidalgo, C., Bull, R., Behrens, M. I. y Donoso, P.** (2004). Redox regulation of RyR-mediated Ca<sup>2+</sup> release in muscle and neurons. *Biol Res* **37**, 539-52.

**Hidalgo, C., Donoso, P. y Carrasco, M. A.** (2005). The ryanodine receptors Ca<sup>2+</sup> release channels: cellular redox sensors? *IUBMB Life* **57**, 315-22.

**Ho, R. C., Hirshman, M. F., Li, Y., Cai, D., Farmer, J. R., Aschenbach, W. G., Witczak, C. A., Shoelson, S. E. y Goodyear, L. J.** (2005). Regulation of I $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C794-801.

**Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. y Rao, A.** (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **17**, 2205-32.

**Hopfl, G., Ogunshola, O. y Gassmann, M.** (2004). HIFs and tumors-causes and consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R608-23.

**Hoppeler, H., Kleinert, E., Schlegel, C., Claassen, H., Howald, H., Kayar, S. R. y Cerretelli, P.** (1990). Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia. *Int J Sports Med* **11 Suppl 1**, S3-9.

**Hoppeler, H. y Vogt, M.** (2001a). Hypoxia training for sea-level performance. Training high-living low. *Adv Exp Med Biol* **502**, 61-73.

**Hoppeler, H. y Vogt, M.** (2001b). Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol* **204**, 3133-9.

**Hoppeler, H., Vogt, M., Weibel, E. R. y Fluck, M.** (2003). Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol* **88**, 109-19.

**Hunter, R. B., Stevenson, E., Koncarevic, A., Mitchell-Felton, H., Essig, D. A. y Kandarian, S. C.** (2002). Activation of an alternative NF-kB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *Faseb J* **16**, 529-38.

**Jackman, R. W. y Kandarian, S. C.** (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C834-43.

**Jewell, U. R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R. H. y Gassmann, M.** (2001). Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb J* **15**, 1312-4.

**Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., Steinhafel, N. y Vina, J.** (2004). Acute exercise activates nuclear factor NF-kB signaling pathway in rat skeletal muscle. *Faseb J* **18**, 1499-506.

**Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C. y Marti, H. H.** (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* **271**, C1172-80.

**Kennedy, M. B., Beale, H. C., Carlisle, H. J. y Washburn, L. R.** (2005). Integration of biochemical signalling in spines. *Nat Rev Neurosci* **6**, 423-34.

**Kubis, H. P., Hanke, N., Scheibe, R. J., Meissner, J. D. y Gros, G.** (2003). Ca<sup>2+</sup> transients activate calcineurin/NFATc1 and initiate fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle culture. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C56-63.

**Kumar, A. y Boriek, A. M.** (2003). Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *Faseb J* **17**, 386-96.

**Laderoute, K. R., Calaoagan, J. M., Gustafson-Brown, C., Knapp, A. M., Li, G. C., Mendonca, H. L., Ryan, H. E., Wang, Z. y Johnson, R. S.** (2002). The response of c-jun/AP-1 to chronic hypoxia is hypoxia-inducible factor 1 alpha dependent. *Mol Cell Biol* **22**, 2515-23.

**Lewis, R. S.** (2003). Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans* **31**, 925-9.

**Lilienbaum, A. y Israel, A.** (2003). From calcium to NF-kB signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol* **23**, 2680-98.

**Liu, Y., Cseresnyes, Z., Randall, W. R. y Schneider, M. F.** (2001). Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* **155**, 27-39.

**McArdle, A., Pattwell, D., Vasilaki, A., Griffiths, R. D. y Jackson, M. J.** (2001). Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C621-7.

**McCullagh, K. J., Calabria, E., Pallafacchina, G., Ciciliot, S., Serrano, A. L., Argentini, C., Kalhovde, J. M., Lomo, T. y Schiaffino, S.** (2004). NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10590-5.

**Meissner, G.** (2002). Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front Biosci* **7**, d2072-80.

**Meissner, G.** (2004). Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium* **35**, 621-8.

**Mellström, B. y Naranjo, J. R.** (2001). Mechanisms of Ca<sup>2+</sup>-dependent transcription. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 312-9.

**Michiels, C., Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Piret, J. P. y Raes, M.** (2001). HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life* **52**, 49-53.

**Michiels, C., Minet, E., Mottet, D. y Raes, M.** (2002). Regulation of gene expression by oxygen: NF- $\kappa$ B and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* **33**, 1231-42.

**Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J. y Michiels, C.** (2000). ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* **468**, 53-8.

**Mottet, D., Michel, G., Renard, P., Ninane, N., Raes, M. y Michiels, C.** (2002). ERK and calcium in activation of HIF-1. *Ann N Y Acad Sci* **973**, 448-53.

**Mottet, D., Michel, G., Renard, P., Ninane, N., Raes, M. y Michiels, C.** (2003). Role of ERK and calcium in the hypoxia-induced activation of HIF-1. *J Cell Physiol* **194**, 30-44.

**Musaro, A., McCullagh, K. J., Naya, F. J., Olson, E. N. y Rosenthal, N.** (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* **400**, 581-5.

**Nishimoto, S. y Nishida, E.** (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* **7**, 782-6.

**Oba, T., Ishikawa, T., Murayama, T., Ogawa, Y. y Yamaguchi, M.** (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethanol act synergistically to gate ryanodine receptor/calcium-release channel. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1366-74.

**Olson, E. N. y Williams, R. S.** (2000). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* **101**, 689-92.

**Pei, J. M., Kravtsov, G. M., Wu, S., Das, R., Fung, M. L. y Wong, T. M.** (2003). Calcium homeostasis in rat cardiomyocytes during chronic hypoxia: a time course study. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1420-8.

**Pei, J. M., Yu, X. C., Fung, M. L., Zhou, J. J., Cheung, C. S., Wong, N. S., Leung, M. P. y Wong, T. M.** (2000). Impaired G(s) $\alpha$  and adenylyl cyclase cause  $\beta$ -adrenoceptor desensitization in chronically hypoxic rat hearts. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1455-63.

**Pessah, I. N. y Feng, W.** (2000). Functional role of hyperreactive sulfhydryl moieties within the ryanodine receptor complex. *Antioxid Redox Signal* **2**, 17-25.

**Pessah, I. N., Kim, K. H. y Feng, W.** (2002). Redox sensing properties of the ryanodine receptor complex. *Front Biosci* **7**, a72-9.

**Petersen, O. H.** (2002). Calcium signal compartmentalization. *Biol Res* **35**, 177-82.

**Premkumar, D. R., Mishra, R. R., Overholt, J. L., Simonson, M. S., Cherniack, N. S. y Prabhakar, N. R.** (2000). L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation regulates induction of c-fos transcription by hypoxia. *J Appl Physiol* **88**, 1898-906.

**Reid, M. B. y Durham, W. J.** (2002). Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 108-16.

**Rhee, S. G., Bae, Y. S., Lee, S. R. y Kwon, J.** (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* **2000**, PE1.

**Rosenberg, P., Hawkins, A., Stiber, J., Shelton, J. M., Hutcheson, K., Bassel-Duby, R., Shin, D. M., Yan, Z. y Williams, R. S.** (2004). TRPC3 channels confer cellular memory of recent neuromuscular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9387-92.

**Roux, P. P. y Blenis, J.** (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-44.

**Sakamoto, K. y Goodyear, L. J.** (2002). Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol* **93**, 369-83.

**Salama, G., Menshikova, E. V. y Abramson, J. J.** (2000). Molecular interaction between nitric oxide and ryanodine receptors of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal* **2**, 5-16.

**Salnikow, K., Kluz, T., Costa, M., Piquemal, D., Demidenko, Z. N., Xie, K. y Blagosklonny, M. V.** (2002). The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Mol Cell Biol* **22**, 1734-41.

**Schiaffino, S. y Serrano, A.** (2002). Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 569-75.

**Semsarian, C., Wu, M. J., Ju, Y. K., Marciniak, T., Yeoh, T., Allen, D. G., Harvey, R. P. y Graham, R. M.** (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* **400**, 576-81.

**Seta, K., Kim, H. W., Ferguson, T., Kim, R., Pathrose, P., Yuan, Y., Lu, G., Spicer, Z. y Millhorn, D. E.** (2002). Genomic and physiological analysis of oxygen sensitivity and hypoxia tolerance in PC12 cells. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 379-88.

**Seta, K. A. y Millhorn, D. E.** (2004). Functional genomics approach to hypoxia signaling. *J Appl Physiol* **96**, 765-73.

**Seta, K. A., Yuan, Y., Spicer, Z., Lu, G., Bedard, J., Ferguson, T. K., Pathrose, P., Cole-Strauss, A., Kaufhold, A. y Millhorn, D. E.** (2004). The role of calcium in hypoxia-induced signal transduction and gene expression. *Cell Calcium* **36**, 331-40.

**Silveira, L. R., Pereira-Da-Silva, L., Juel, C. y Hellsten, Y.** (2003). Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radic Biol Med* **35**, 455-64.

**Soucek, T., Cumming, R., Dargusch, R., Maher, P. y Schubert, D.** (2003). The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide. *Neuron* **39**, 43-56.

**Stiber, J. A., Tabatabaei, N., Hawkins, A. F., Hawke, T., Worley, P. F., Williams, R. S. y Rosenberg, P.** (2005). Homer modulates NFAT-dependent signaling during muscle differentiation. *Dev Biol* **287**, 213-24.

**Suko, J., Drobny, H. y Hellmann, G.** (1999). Activation and inhibition of purified skeletal muscle calcium release channel by NO donors in single channel current recordings. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 271-87.

**Sun, J., Xin, C., Eu, J. P., Stamler, J. S. y Meissner, G.** (2001a). Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11158-62.

**Sun, J., Xu, L., Eu, J. P., Stamler, J. S. y Meissner, G.** (2001b). Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* **276**, 15625-30.

**Sun, J., Xu, L., Eu, J. P., Stamler, J. S. y Meissner, G.** (2003). Nitric oxide, NOC-12, and S-nitrosoglutathione modulate the skeletal muscle calcium release channel/ryanodine receptor by different mechanisms. An allosteric function for O<sub>2</sub> in S-nitrosylation of the channel. *J Biol Chem* **278**, 8184-9.

**Thomas, G. M. y Huganir, R. L.** (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**, 173-83.

**Tian, B. y Brasier, A. R.** (2003). Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. *Recent Prog Horm Res* **58**, 95-130.

**Toescu, E. C.** (2004). Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases. *Cell Calcium* **36**, 187-99.

**Valdes, J. A., Hidalgo, J., Galaz, J. L., Puentes, N., Silva, M., Jaimovich, E. y Carrasco, M. A.** (2007). NF-κB Activation by Depolarization of Skeletal Muscle Cells Depends on Ryanodine and IP3 Receptors-Mediated Calcium Signals. *Am J Physiol Cell Physiol.*, en prensa.

**Ventura, N., Hoppeler, H., Seiler, R., Binggeli, A., Mullis, P. y Vogt, M.** (2003). The response of trained athletes to six weeks of endurance training in hypoxia or normoxia. *Int J Sports Med* **24**, 166-72.

**Vogt, M., Puntschart, A., Geiser, J., Zuleger, C., Billeter, R. y Hoppeler, H.** (2001). Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* **91**, 173-82.

**Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. y Semenza, G. L.** (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-4.

**Wei, Y., Sowers, J. R., Nistala, R., Gong, H., Uptergrove, G. M., Clark, S. E., Morris, E. M., Szary, N., Manrique, C. y Stump, C. S.** (2006). Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **281**, 35137-46.

**Wenger, R. H. y Gassmann, M.** (1997). Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* **378**, 609-16.

**Wenger, R. H., Stiehl, D. P. y Camenisch, G.** (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* **2005**, re12.

**Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G. y Stamler, J. S.** (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* **279**, 234-7.

**Yermolaieva, O., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H. y Hoshi, T.** (2000). Reactive oxygen species and nitric oxide mediate plasticity of neuronal calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 448-53.

**Zuo, L. y Clanton, T. L.** (2005). Reactive oxygen species formation in the transition to hypoxia in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C207-16.