

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**ACTIVIDAD DE CALCINEURINA Y SU POSIBLE
PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE ERK 1/2 Y
CREB EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS
DESPOLARIZADAS**

NATALIA ANDREA PUENTES LÓPEZ

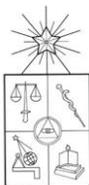
Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: Dra. MARÍA ANGÉLICA CARRASCO FRIZ

PROYECTO FONDECYT N°1030988

Santiago - Chile

- 2004 -



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**ACTIVIDAD DE CALCINEURINA Y SU POSIBLE
PARTICIPACIÓN EN LA REGULACION DE ERK 1/2 Y
CREB EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS
DESPOLARIZADAS**

NATALIA ANDREA PUENTES LÓPEZ

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
Profesor guía:	Dra. María Angélica Carrasco Friz
Profesor consejero:	Dr. Enrique Jaimovich
Profesor consejero:	Dr. Eduardo Kessi

Santiago - Chile

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Señales de calcio en músculo.....	4
2.2. ERKs y CREB en músculo.....	5
2.3. Aspectos generales sobre CREB y ERKs.....	6
2.4. Mecanismos de activación de CREB y ERKs: Activación en células excitables.....	7
2.5. Mecanismos de desactivación de CREB y ERKs.....	8
2.6. Propiedades generales de las fosfatasas.....	8
2.7. Calcineurina en músculo esquelético.....	9
2.8. Fosfatasas que afectan a CREB.....	10
2.9. Fosfatasas que afectan a ERKs.....	11
3. HIPÓTESIS.....	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1. MATERIALES.....	15
5.2. MÉTODOS.....	17
6. RESULTADOS.....	22
6.1. Activación de CaN por estimulación con K+.....	22
6.2. Activación de CaN por estimulación eléctrica.....	23
6.3. Estudio del efecto de la señal rápida en la activación de CaN con estimulación eléctrica.....	24

6.4. Estudio del efecto de la señal rápida en la activación de CaN utilizando como estímulo K+.....	26
6.5. Estudio del efecto de la señal lenta en la activación de CaN, utilizando K+ como estímulo.....	27
6.6. Efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de CREB fosforilado.....	28
6.7. Efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2.....	30
6.8. CaN participa en la desfosforilación de P-ERK2 en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico.....	31
6.9. CaN participa en la desfosforilación de P-CREB en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico.....	33
6.1.0. Efecto de la inhibición de CaN sobre los niveles de fosforilación de CREB en miotubos despolarizados con K+.....	34
6.1.1. La inhibición de PP2A, no altera la desfosforilación de CREB, en miotubos despolarizados con K+.....	34
6.1.2. La inhibición de PP2A, no altera la desfosforilación de ERK1/2, en miotubos despolarizados con K+.....	36
6.1.3. Efecto de PP1 sobre CREB y ERK1/2 en miotubos despolarizados con K+.....	37
6.1.4. La inhibición de PP1 no altera significativamente la desfosforilación de ERK1/2.....	37
6.1.5. Efecto de PP1 sobre CREB.....	39
7. DISCUSION.....	40
7.1. Actividad de calcineurina.....	40
7.2. CaN participa en la desfosforilación de P-CREB y P-ERK1/2 en células musculares esqueléticas despolarizadas con estímulo eléctrico.....	42
7.3. Efecto de PP2A y PP1 en CREB y ERK1/2 en nuestro modelo.....	44
8. CONCLUSIONES.....	46

9. ANEXO..... 47

Figuras de revisión bibliográfica:

Fig 1. Imagen de miotubo.....47

Fig 2. Esquematización de señal rápida de calcio..... 48

Fig 3. Esquematización de señal lenta de calcio.....49

Fig 4. Señales de calcio en miotubos de rata despolarizadas con K+..... 50

Fig 5. Imagen de calcio obtenida mediante la utilización de fluorescencia con fluo 3, por microscopia confocal en miotubos de rata..... 51

Fig 6. Efecto de K+ sobre ERK 1/2 y CREB en cultivo primario de rata..... 52

Fig 7. Efecto de 2-APB en las señales de calcio en miotubos de rata despolarizados con K+..... 53

Fig 8. Inhibición de P-ERK 1/2 y P-CREB en células musculares esqueléticas despolarizadas en presencia del inhibidor de la señal lenta.....54

Fig 9. Esquema de la activación de CaN en neuronas..... 55

Fig 10. Efecto del ácido okadaico (OA) sobre la fosforilación de CREB en neuronas..... 56

10. BIBLIOGRAFÍA..... 57

INDICE DE FIGURAS DE RESULTADOS:

Fig 11. Activación de CaN por estimulación con K+.....	22
Fig 12. Activación de CaN por estimulación eléctrica.....	23
Fig 13. Efecto de ryanodina 25µM sobre CaN en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico.....	25
Fig 14. Efecto de ryanodina 25µM sobre CaN en miotubos despolarizados con K+.....	26
Fig 15. Efecto de 2-APB 50µM sobre CaN en miotubos despolarizados con K+.....	27
Fig 16. Efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de CREB fosforilado.....	29
Fig 17. Efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de ERK1/2 fosforilado.....	30
Fig 18. Efecto de ciclosporina A (CsA) 1µM sobre ERK1/2 en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico.....	32
Fig 19. Efecto de CsA 1 µM sobre CREB en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico.....	33
Fig 20. Efecto del ácido okadaico (OA) 5nM sobre el nivel de fosforilación de CREB en miotubos despolarizados con K+.....	35
Fig 21. Efecto del ácido okadaico (OA) 5nM sobre ERK1/2 en miotubos despolarizados con K+.....	36
Fig 22. Efecto del ácido okadaico (OA) 500nM sobre el nivel de fosforilación de ER K1/2 en miotubos despolarizados con K+.....	38
Fig 23. Efecto del ácido okadaico 500nM en el nivel de fosforilación de CREB en miotubos despolarizados con K+.....	39

ABREVIATURAS

- **μm:** Micro metro (10^{-6} metros).
- **μM:** Micro Molar (10^{-6} Molar).
- **μg:** Micro gramo.
- **μl:** Micro litro.
- **2-APB:** 2-aminoetoxidifenil borato
- **AMPc:** Adenosina Monofosfato Cíclico.
- **Ca:** Calcio.
- **Ca-CaM:** Calcio-calmodulina.
- **CAMK:** Quinasas dependientes de calcio-calmodulina.
- **CaN:** Calcineurina.
- **cm:** Centímetro.
- **CREB:** proteína de unión al elemento sensible de respuesta a AMPc y Calcio
- **CsA:** Ciclosporina A.
- **DAG:** Diacilglicerol.
- **DHPR:** Receptor de dihidropiridina.
- **DMSO:** Dimetilsulfoxido.
- **DNA:** Ácido dexoxiribonucleico.
- **E-C:** excitación-contracción.
- **EGTA:** Ácido etilenbis (oxietilenitrilo) tetraacético.
- **ERKs:** proteína quinasa dependiente de estímulos extracelulares.
- **Hz:** Hertz.
- **I-1:** Proteína inhibitoria 1.
- **IP₃:** Inositoltrifosfato.
- **ISO:** Isoprotenerol.
- **MAPKs:** proteínas quinasas activadas por mitógenos
- **ml:** Mililitro.
- **mM:** Mili molar.
- **NFAT:** Factor nuclear de activación de células T.
- **nM:** Nanomolar.
- **OA:** Ácido okadaico.
- **PBS:** buffer fosfato salino.
- **P-CREB:** CREB fosforilado.
- **P-ERKs:** ERKs fosforilado.
- **PIP₂:** Fosfatidilinositol bifosfato.
- **PKC:** Proteína Kinasa C.
- **PLA₂:** Fosfolipasa A₂.
- **PLC:** Fosfolipasa C.
- **PP:** Proteína fosfatasa.
- **PP1:** Proteína fosfatasa 1.
- **PP2A:** Proteína fosfatasa 2A.
- **PP2B:** Proteína fosfatasa 2B o Calcineurina.
- **PP2C:** Proteína fosfatasa 2C.
- **Rpm:** Revoluciones por minuto.
- **RS:** Retículo sarcoplásmico.
- **RyR:** Receptor de ryanodina.
- **TBS:** Tris-HCl 50 mM, NaCl 2M.
- **TBST:** TBS más tween 20.

RESUMEN

El ejercicio físico afecta tanto el metabolismo energético del músculo esquelético, como el crecimiento de este, incluyendo cambios a nivel de la síntesis de proteínas y de la expresión de genes.

El calcio es una importante señal en la regulación de la transcripción. Resultados del laboratorio indican que la despolarización de células musculares esqueléticas resulta en señales de calcio rápida y lenta, muy definidas en localización subcelular y cinética, y en la activación de algunos intermediarios clásicos de la expresión génica. Entre estos intermediarios se encuentran ERK 1/2 y el factor de transcripción CREB, cuya activación depende de la señal lenta de calcio.

El nivel de fosforilación de estas proteínas, que representa activación, es reflejo de la actividad de quinasas y fosfatasas. Sin embargo, en general se les ha dado mayor atención a las quinasas, conociéndose con menor profundidad las fosfatasas. En músculo esquelético en particular, no se conoce cuales fosfatasas desfosforilan CREB y ERK activados por despolarización.

En este trabajo se determinó que la fosfatasa calcineurina, es activada en nuestro modelo celular por la despolarización generada por dos protocolos, alta concentración de K⁺ extracelular y estimulación eléctrica. En ambos casos la señal lenta de calcio participa parcialmente en la activación de calcineurina. La despolarización de miotubos en presencia de un inhibidor de calcineurina genera un aumento significativo de los niveles de ERK 1 /2 y de CREB fosforilados, indicando la participación de esta fosfatasa en la desfosforilación de ambos intermediarios.

Estudiamos además, el posible rol de las fosfatasas PP1 y PP2A. No hubo cambios significativos en los niveles de activación de CREB y ERK1/2 en miotubos despolarizados en presencia de un inhibidor farmacológico de ambas fosfatasas.

Con esta memoria de título se han complementado estudios del laboratorio, cuyo objetivo es determinar los mecanismos de transducción de señales involucradas en la activación por calcio de CREB y ERK1/2.

SUMMARY

Physical exercise affects skeletal muscle energy metabolism and growth, by changes that include modifications at the level of protein synthesis and gene expression.

Calcium is an important signal in the regulation of transcription. Results of our laboratory indicate that depolarization of skeletal muscle cells induce a rapid and a slow calcium signal, well defined in subcellular localization and kinetics, and the activation of standard mediators of gene expression. Two of these mediators are ERK1/2 and the transcription factor CREB, and their activation depend on the slow calcium signal.

The phosphorylation level of these proteins, representing activation, is a balance of kinases and phosphatases activity. In the literature, the kinases have been more studied than the phosphatases. In skeletal muscle in particular, the phosphatases involved in phospho-CREB and phospho-ERK dephosphorylation have not been studied.

In this work it was determined that the phosphatase calcineurin is activated in skeletal muscle cells by depolarization generated by two protocols, high concentration of extracellular K⁺ and electrical stimulation. In both cases the slow calcium signal partially participate in calcineurin activation. Myotubes depolarization in the presence of a calcineurin inhibitor generates a significant increase of the phosphorylated ERK 1/2 and CREB levels, indicating the participation of this phosphatase in the dephosphorylation of both molecules.

We also studied the possible role of the phosphatases PP1 and PP2A. There were no significant changes in CREB or ERK1/2 levels in myotubes depolarized in presence of a pharmacological inhibitor of both phosphatases.

The results obtained in this thesis have complemented studies in the laboratory, directed to determine signal transduction mechanisms involved in CREB and ERK1/2 activation by calcium.

1. INTRODUCCIÓN

Cualquier célula de un organismo pluricelular, está expuesta a muchas, quizás cientos de señales diferentes de su entorno. Estas señales pueden ser mecánicas, térmicas, eléctricas o químicas, estas últimas solubles, y que pueden estar unidas a la superficie de las células vecinas o encontrarse unidas a la matriz extracelular, la célula por lo tanto puede actuar bajo una gran gama de combinaciones de señalización.

La célula responde selectivamente a éstas, debido a la especificidad adquirida durante la progresiva especialización celular, en el curso de su desarrollo. Por lo tanto una célula puede responder a un diverso número de señales, ya sea diferenciándose, proliferando o desarrollando un conjunto de funciones especializadas.

El sistema de transmisión de señales se compone de elaborados conjuntos de proteínas señales intracelulares. La mayoría de estas proteínas se fosforilan al momento de llegada de la señal, mediante proteínas quinasas capaces de adicionar un fosfato generando la activación de estas proteínas. A su vez estas proteínas activadas fosforilan a otras proteínas generando con esto una “cascada de fosforilaciones”. Así los comportamientos celulares complejos, como son la proliferación y supervivencia, no son estimulados por una sola señal, sino que por combinaciones específicas de señales. La célula debe ser capaz de integrar esta información proveniente de señales diversas para generar con esto una respuesta adecuada ya sea para vivir, morir, proliferar o quedar en reposo proliferativo.

A menudo estas señales recibidas en la superficie de la célula, son reconocidas por receptores de membrana, los cuales a través de cascadas de señalización mediadas por proteínas, llevan la información al interior de la célula. Por otra parte algunas de estas señales son capaces de llegar hasta el núcleo celular, donde alteran la expresión de determinados genes modificándose así el comportamiento de la célula.

Entre los mediadores intracelulares de gran importancia, encontramos al ión calcio, el cual gatilla una amplia gama de respuestas celulares, entre las que se pueden destacar: la secreción, proliferación y contracción muscular.

Las concentraciones de calcio citosólicas de cualquier célula en reposo son extremadamente bajas ($\leq 10^{-7}$ M), siendo su concentración en el fluido extracelular (aprox. 10^{-3} M) y en el retículo sarcoplásmico (RS) muy alta. Con estas diferencias de concentraciones se genera una enorme gradiente de calcio que tiende a llevar el calcio hacia el citosol, tanto a través de la membrana plasmática como a través de la membrana del retículo sarcoplásmico. Cuando una señal es capaz de abrir transitoriamente los canales de calcio en alguna de estas dos membranas, el calcio fluye rápidamente al citosol, incrementando la concentración local de éste y activando mecanismos celulares sensibles a calcio. Entre los mecanismos sensibles al calcio podemos mencionar el de la contracción de las fibras musculares esqueléticas.

Otro efecto del calcio en el músculo esquelético, es la activación de moléculas que modifican la expresión génica. La despolarización de membrana en células musculares esqueléticas en cultivo primario induce un aumento en la concentración de calcio intracelular, que resulta en activación del factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento sensible de respuesta a AMPc y Calcio) y también de ERK (proteína quinasa dependiente de estímulos extracelulares), quinasa que activa diversos factores de transcripción. La actividad de estas proteínas está determinada por su nivel de fosforilación, a través de la actividad de quinasas, las cuales activan estos factores y de fosfatasas que los desfosforilan para disminuir la señal.

Las desfosforilaciones están a cargo de un gran número de fosfatasas, de las cuales nos interesa mencionar las fosfatasas de serinas/treoninas, que catalizan la desfosforilación de serinas y treoninas fosforiladas de diversas proteínas, entre las cuales encontramos a las proteínas CREB y ERK.

Entre las fosfatasas mayormente descritas encontramos a la proteína fosfatasa 1 (PP1), proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la proteína fosfatasa 2B (PP2B) conocida también con el nombre de calcineurina (CaN), esta última nos merece mayor

atención debido a que su regulación esta dada por el ión calcio y además se ha descrito su presencia en numerosos tipos celulares incluyendo células nerviosas, musculares esqueléticas y cardíacas.

CaN en músculo esquelético es capaz de gatillar una serie de cambios a nivel de la expresión génica como, por ejemplo, favorecer la hipertrofia muscular, provocando un aumento de las proteínas contráctiles y de la maquinaria metabólica que sustenta la actividad muscular.

Este estudio pretende determinar el efecto de señalización temprana de la CaN en células musculares esqueléticas, ya que no se encuentra del todo dilucidado. Para ello se analizará en el modelo celular de cultivo primario de células musculares esqueléticas de rata, la activación de CaN por calcio inducido por despolarización y determinar, si esta activación de CaN esta dada por una liberación de calcio rápida en el tiempo, asociada al proceso de contracción muscular o es activada por una liberación de calcio más tardía en el tiempo, asociada a cambios a nivel de la expresión génica o bien tiene relación con ambas señales de calcio. Para esto se utilizarán inhibidores específicos de cada liberación de calcio. Por último, pretende determinar mediante la utilización de la técnica Western blot, el efecto que tiene esta fosfatasa sobre los niveles de CREB y ERK activados, cuyo papel en la expresión génica es relevante.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En múltiples tipos de células mamíferas, los niveles intracelulares de calcio controlan un gran número de funciones celulares, incluyendo la división celular, secreción, expresión de genes, motilidad celular y contracción muscular (Berridge *et al.*, 2000).

2.1 Señales de calcio en músculo

En células musculares esqueléticas, la despolarización provoca un aumento de calcio intracelular a través de un mecanismo complejo que será descrito a continuación (Jaimovich *et al.*, 2000). La despolarización de la membrana plasmática de células musculares esqueléticas en cultivo se obtiene ya sea por la aplicación de altas concentraciones externas de potasio (Jaimovich *et al.*, 2000) o por estimulación eléctrica (Eltit *et al.*, 2004). Esta despolarización se propaga a los túbulos transversales o túbulos T (invaginaciones de membrana), en los cuales hay una alta densidad de receptores que en músculo esquelético actúan como sensores de potencial, los receptores de dihidropiridinas (DHPR). Al sentir el potencial, los DHPR sufren un cambio conformacional que se transmite a los receptores de ryanodina (RyR), canales de calcio presentes en las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático (RS). Es importante destacar que los túbulos T se encuentran muy cercanos a las cisternas terminales del RS (Figura 1, ver anexo). Los cambios conformacionales del RyR gatillan su apertura y la liberación de calcio al citoplasma (Jaimovich *et al.*, 2000) (Figura 2, ver anexo). Esta liberación de calcio resulta en un aumento transitorio rápido de calcio que aparece en un tiempo menor de 1 segundo luego del estímulo despolarizante, que es visualizado mediante microscopía confocal en toda la célula muscular y que está relacionado directamente con el proceso de contracción muscular (Jaimovich *et al.*, 2000).

Paralelamente, la despolarización sensada por los DHPR, a través de mecanismos todavía en estudio, induce la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato

(PIP2), lípido de membrana, generándose dos moléculas: inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 se une a su receptor que es un canal de calcio, receptor de IP3 (IP3R), localizado a nivel del RS y del núcleo (Powell *et al.*, 2001). La activación del IP3R genera una segunda liberación de calcio, tanto al citoplasma como al interior del núcleo que no induce contracción muscular (Jaimovich and Carrasco, 2002) (Figura 3, ver anexo). Esta segunda liberación de calcio tiene la característica de ser más tardía y de mayor duración en el tiempo, ya que ocurre entre 5 a 20 segundos luego del estímulo despolarizante (Figura 4, ver anexo), visualizándose mediante la técnica de microscopía confocal principalmente en los núcleos y en la zona citoplasmática adyacente (Figura 5, ver anexo).

2.2 ERK y CREB en músculo

Además de inducir estas dos liberaciones de calcio, la despolarización de células musculares esqueléticas resulta en la activación de algunos intermediarios clásicos de la expresión génica. Entre ellos se encuentran el factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta CRE) y la proteína quinasa dependiente de estímulos extracelulares ERK, quinasa que presenta dos isoformas 1 y 2, que a su vez activa varios factores de transcripción (Figura 6, ver anexo) (Powell *et al.*, 2001; Jaimovich and Carrasco, 2002; Carrasco *et al.*, 2003).

Se ha determinado en trabajos del laboratorio, que la activación tanto de CREB como de ERK inducida por despolarización, depende de la segunda señal de calcio (Powell *et al.*, 2001; Jaimovich and Carrasco, 2002; Carrasco *et al.*, 2003). Esto se ha comprobado en experimentos en los que se han incubado células músculo esqueléticas en cultivo con 2-APB (2-aminoetoxidifenil borato) a concentraciones micromolares (μM). Este compuesto tiene la capacidad de inhibir a la segunda señal de calcio (Figura 7, ver anexo), observándose también con esto la inhibición de la fosforilación de ambas proteínas (Figura 8, ver anexo) (Powell *et al.*, 2001). También se ha utilizado ryanodina, inhibidor específico del

RyR a concentraciones μM , que bloquea la primera liberación de calcio, es decir, la señal rápida. A diferencia de lo demostrado con el inhibidor 2-APB, con ryanodina no se observaron cambios significativos en la fosforilación de ambas proteínas (Powell *et al.*, 2001; Jaimovich and Carrasco, 2002; Carrasco *et al.*, 2003).

Estos resultados sugieren una señalización mediada por calcio e IP₃, que podría estar involucrada en la regulación de la expresión de genes en músculo esquelético (Carrasco *et al.*, 2003). Así, numerosos estudios realizados principalmente en neuronas, han demostrado que el aumento intracelular de calcio regula factores de transcripción y modula la estructura de la cromatina (Berridge *et al.*, 2000; Mellstrom and Naranjo, 2001). El músculo esquelético responde al ejercicio o a estímulos eléctricos, con cambios en la expresión de genes a nivel de proteínas estructurales y de enzimas del metabolismo energético de enzimas, y los mecanismos por los cuales el calcio regula la expresión, no están definidos (Carrasco *et al.*, 2003).

2.3 Aspectos generales sobre CREB y ERKs

CREB forma parte de la familia de los factores de transcripción bZIP (cierre de leucina), que son proteínas que tienen la capacidad de unirse al DNA (Shaywitz and Greenberg, 1999).

La activación de CREB es mediada por AMPc y por calcio. Esta proteína (CREB) tiene la capacidad de regular la transcripción de un gran número de genes a través de la unión a la secuencia regulatoria de DNA denominada CRE (elemento de respuesta a AMPc) activando un gran número de genes (Miyata *et al.*, 2001). La activación de CREB es producto de su fosforilación en un residuo de aminoácido específico, serina 133, mediada por una serie de proteínas quinasas, varias de ellas dependientes de calcio. La fosforilación estimula la actividad transcripcional de CREB sin afectar sus propiedades de unión al DNA. Si este residuo de serina se modifica por mutación, CREB resulta inactivo, no pudiendo estimular la

transcripción de los genes blanco en respuesta al estímulo que normalmente lo activa (Alberts *et al.*, 1994).

Por otro lado ERK es una quinasa que forma parte de la familia de las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos) (Zhou *et al.*, 2002), cuya activación esta dada por una cascada de fosforilaciones de la vía de señalización de Ras, una pequeña proteína G. Ras activa a Raf, a su vez este activa a MEK (MAPK/ERK) y este a ERKs (Figura 3). ERKs actúa sobre muchos sustratos, ya sea a nivel citoplasmático, como a nivel nuclear, pudiendo afectar directamente la expresión de genes por fosforilación de factores de transcripción entre los cuales se pueden citar a CREB, Ets, Elk (Hindley and Kolch, 2002). La activación de ERKs por MEK está dada por la fosforilación de treoninas y tirosinas específicas (Zhou *et al.*, 2002).

2.4 Mecanismos de activación de CREB y ERKs: Activación en células excitables

Conociendo que la activación de CREB y ERKs por despolarización depende de calcio, es necesario determinar cuales son las moléculas blanco de calcio que están río arriba de estos dos intermediarios de expresión génica. Esto se ha estudiado en el laboratorio para la activación de CREB y de ERKs, como se describirá mas adelante.

Entre las proteínas quinasas que activan CREB se encuentran la proteína quinasa A (PKA, activada por AMPc), proteína quinasa C (PKC), las proteínas quinasas dependientes de calcio-calmodulina (CAMK), y las ERKs a través de quinasas río abajo (Shaywitz and Greenberg, 1999). En neuronas de hipocampo la activación de CREB por despolarización es mediada por CaMK y por ERK (Wu *et al.*, 2001). Es necesario destacar que ERK activado, también es crucial en neuronas para el desarrollo de plasticidad (Bading 2000).

Entre las distintas quinasas analizadas en células musculares esqueléticas en cultivos primarios despolarizadas, se ha determinado que ERKs y PKC fosforilan CREB (Carrasco *et al.*, 2003, Cárdenas *et al.*, 2002). Es importante señalar que

una isoforma de PKC dependiente de calcio está involucrada en la fosforilación de CREB. La participación de estas quinasas se determinó utilizando inhibidores farmacológicos de PKC o de la quinasa que activa ERK, durante los experimentos de despolarización, con el resultado de la disminución significativa de P-CREB (CREB fosforilado) (Carrasco *et al.*, 2003, Cárdenas *et al.*, 2002). Con la misma aproximación, se determinó que CaMK y PKA no fosforilan CREB en nuestro modelo experimental.

Con respecto a ERKs, se determinó en el laboratorio que las quinasas, PKA, PKC y CaMK, no afectan la activación de ERKs, en células musculares esqueléticas. Sin embargo este trabajo sigue en estudio.

2.5 Mecanismos de desactivación de CREB y ERKs

Los niveles de fosforilación de CREB y de ERKs son reflejo de la actividad de quinasas y fosfatasas. Sin embargo, en general se les ha dado mayor atención a las quinasas, conociéndose con menor profundidad las fosfatasas (Ahn *et al.*, 2000). En músculo esquelético en particular, no se conoce cuales fosfatasas desfosforilan CREB y ERK activados por despolarización. Esta información es necesaria para el mayor conocimiento de los distintos eventos moleculares que acompañan a la despolarización.

2.6 Propiedades generales de las fosfatasas

Cohen, 1994; sugiere la clasificación de las proteínas fosfatasas (PP), de acuerdo a aquellas encontradas en mamíferos, y que son específicas en la desfosforilación de los aminoácidos serinas y treoninas. A estas las divide en los grupos de: proteína fosfatasa 1 (PP1) y proteína fosfatasa 2 (PP2). El tipo PP2, se subdivide a su vez en proteína fosfatasa 2A (PP2A), proteína fosfatasa 2B, también conocida como calcineurina (CaN) o (PP2B) y proteína fosfatasa 2C (PP2C) (Herzig and Neumann, 2000).

PP2B (CaN) se caracteriza por requerir calcio y calmodulina (Ca-CaM) para su activación, mientras que la PP2C necesita de magnesio (Mg⁺²) (Herzig and

Neumann, 2000). Calcineurina es una fosfatasa de serinas y treoninas fosforiladas, de ubicación citoplasmática, compuesta de dos subunidades, una catalítica (CaN A) de 60kDa y una reguladora (CaN B) de 19kDa; y es activada por calcio y calmodulina (Ca-CaM) como ya fue indicado (Klee *et al.*, 1998). Es importante destacar que calmodulina (CaM) es una proteína que une calcio. CaM actúa como un receptor intracelular polivalente de calcio, que media la mayoría de los procesos regulados por este. Ca-CaM no tiene actividad enzimática, sino que actúa uniéndose a otras proteínas produciendo su activación (Alberts *et al.*, 1994). Con respecto a PP1 y PP2A, existe información que su actividad en neuronas puede ser modificada por calcio (Sim and Ludowyke, 2002), pero no se ha descrito dependencia absoluta sobre este ión a diferencia de CaN.

Se puede estudiar la participación de estas diferentes fosfatasas mediante el uso de inhibidores específicos. El ácido okadaico (OA), es un potente inhibidor de PP1 y PP2A, el cual actúa sobre PP1 a concentraciones micromolares (μM) y sobre PP2A a concentraciones del intervalo nanomolar (nM) (Bito *et al.*, 1996). CaN es insensible a inhibidores de PP1 y PP2A. Sin embargo drogas inmunosupresoras como son ciclosporina A (CsA) y FK506, inhiben la actividad de ésta (Winder and Sweatt, 2001), mediante la formación de complejos endógenos, de ciclofilina y FKBP12 (FK506 unido a proteína 12, proteína que se encuentra en el receptor de IP3 y ryanodina, que une a FK506), respectivamente. Estos complejos se unen a la subunidad A de CaN, es decir la subunidad catalítica de CaN (Schiaffino and Serrano, 2002).

2.7 Calcineurina en músculo esquelético

En músculo esquelético se han obtenido imágenes mediante microscopia confocal y fluorescencia, de fibras musculares rápidas, utilizando un anticuerpo anti-CnB, que revela la distribución difusa en el citoplasma de CaN, similar a la distribución que se observa en células neuronales, ubicándose en la periferia de la fibra muscular (Sachetto *et al.*, 2002).

Se ha descrito que CaN juega un rol central en procesos de transducción de señales para el control de la expresión de genes involucrado en el crecimiento hipertrófico en células cardíacas y musculares esqueléticas (Olson and Williams, 2000). En estas células musculares CaN desfosforila y transloca al núcleo a NFAT (Factor nuclear de activación de células T) y MEF2, ambos factores transcripcionales, que están implicados en respuestas hipertróficas (Sachetto *et al.*, 2002). Otro efecto de CaN a nivel de expresión génica descrito en músculo esquelético es la conversión de fibras musculares rápidas a fibras musculares lentas (Dunn *et al.*, 2001). Los mecanismos de transducción de señales se conocen parcialmente, requiriendo ser estudiados en mayor detalle.

2.8 Fosfatasas que afectan a CREB

Entre las fosfatasas que tienen a CREB como sustrato, podemos encontrar principalmente la PP1 y la PP2B o CaN. En neuronas, se ha determinado que ambas fosfatasas colaboran en producir la desfosforilación de P-CREB (Bito *et al.*, 1996). Muy brevemente, la fosfatasa PP1 desfosforilaría directamente a P-CREB, pero para que esto ocurra, PP1 debe ser activada. CaN al ser activada por calcio-calmodulina (Ca-CaM), activa a PP1, pero no directamente sino que a través de otra proteína, la proteína inhibitoria 1 (I-1), la cual al encontrarse en estado de activación, es decir fosforilada, ejerce un efecto inhibitorio sobre PP1. I-1 al ser desfosforilada por CaN pierde su capacidad de inhibir a PP1, por lo tanto PP1 queda activada induciendo la desfosforilación de P-CREB (Figura 9, ver anexo). Es importante señalar que aunque este modelo se conoce en células nerviosas (Bito *et al.*, 1996), no se ha estudiado en células musculares esqueléticas.

En trabajos en células PC12, se utilizó la presencia del inhibidor OA, en los cuales se demostró que PP1 es una de las proteínas fosfatasas que predominan en la desfosforilación de P-CREB (Hagiwara *et al.*, 1992).

En neuronas también fue descrito, que a altas concentraciones de OA, de dosis de los μM , se bloquea la desfosforilación de P-CREB (Figura 10, ver anexo) (Chang and Berg, 2001).

En otros trabajos en células PC12, se menciona a la proteína PP2A de localización nuclear, como una de las proteínas fosfatasas más importantes en la desfosforilación de P-CREB (Wadzinski *et al.*, 1993). Así también se ha descrito que, la inhibición de PP2A, por concentraciones nM de OA, incrementan los niveles de CREB fosforilado (Zakany *et al.*, 2002).

2.9 Fosfatasas que afectan a ERKs

La desfosforilación de ERKs puede ocurrir por diferentes fosfatasas, según el tipo celular y el estímulo (Zhou *et al.*, 2002). Esto significa que pueden ser desfosforiladas en treonina o tirosina o en ambas. La acción de CaN sobre ERKs está descrita en algunos sistemas celulares. En cardiomiocitos de roedores por ejemplo, la estimulación de ERKs por angiotensina II, es inhibida por CsA, inhibidor de CaN (Murat *et al.*, 2000). También se describen resultados en cultivos de cardiomiocitos, en los cuales la estimulación generada por isoprotenerol (ISO) induce la activación de la quinasa ERKs lo que resulta en hipertrofia. La utilización de inhibidores como son CsA y FK506, inhibidores altamente específicos de CaN, permitieron observar una inhibición significativa de la activación de ERKs, y de la hipertrofia cardiaca, por lo tanto se concluyó con estos resultados que CaN, es requerida para la activación de ERKs. El mecanismo de cómo CaN activa a ERKs no es conocido hasta ahora (Zou *et al.*, 2001). Estudios realizados a nivel neuronal en invertebrados como *Aplysia*, mostraron que la inhibición de CaN, mediante inhibidores específicos, facilita la activación de las MAPK, permitiendo una mejoría en la capacidad de memoria de este invertebrado (Sharma *et al.*, 2002).

Los estudios anteriormente descritos nos indican que CaN puede activar o inhibir a ERKs. Probablemente esto refleja efectos directos o indirectos de CaN sobre ERK.

Con respecto a PP2A, existen varios antecedentes sobre efectos de esta fosfatasa sobre los niveles de ERKs. En células NIH-3T3 se ha descrito que la proteína PP2A actúa sobre elementos río arriba de ERKs, Raf y MEK, desfosforilándolos (Bhalla *et al.*, 2002). En cultivos celulares de COS-7 y 293-T, se describen

resultados de PP2A sobre ERKs que son complejos. Por un lado PP2A es un regulador positivo de Raf-1, en cambio desfosforila e inactiva a MEK y a ERK (Mitsubishi *et al.*, 2003).

Con respecto a PP1 y ERKs, se describe en este mismo trabajo, que al utilizar el inhibidor de PP1, tautomycin, se suprime la activación de Raf, resultando en la inactivación de MEK-ERK. Con lo que se puede concluir que PP1 es requerida para la activación de Raf y del efecto que ejerce este sobre MEK y ERKs (Mitsubishi *et al.*, 2003).

Es importante destacar que estas proteínas no han sido estudiadas a nivel de cultivo primario de músculo esquelético, por lo tanto es importante determinar que efecto ejercen en la desfosforilación de las proteínas CREB y ERKs, en células musculares esqueléticas.

Este proyecto plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

3. HIPÓTESIS

“La proteína fosfatasa calcineurina es activada por el ión calcio, cuya liberación es inducida por despolarización de células musculares esqueléticas, y participa en la inactivación de ERKs y CREB”.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Analizar la participación de calcineurina en la modulación de ERKs y del factor transcripcional CREB en un modelo celular de músculo esquelético despolarizado.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la actividad de calcineurina en células musculares esqueléticas despolarizadas.
- Evaluar la actividad de calcineurina en relación a las dos señales de calcio de diferentes características que se inducen por despolarización de células musculares esqueléticas.
- Determinar posible efecto de calcineurina en dos moléculas fosforiladas en este modelo celular, ERKs y CREB.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES:

Medio de Cultivo:

Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma) y medio nutriente F12 que contiene suero de bovino, suero fetal de bovino, ampicilina, streptomycin, anfotericina B y colagenasa en proporción 1:1 (Life Technologies, Burlington, Ontario).

Inhibidores:

- Ciclosporina A (Cs A), Sandoz ®: droga inmunosupresora, bloquea la actividad de la calcineurina *in vitro* y en vivo, formando complejos endógenos con ciclofilina, uniéndose a la subunidad catalítica de la CaN (Schiaffino y Serrano, 2002).
- Acido okadaico, Biomol ®: Potente y selectivo inhibidor de proteínas fosfatasa. Actúa principalmente sobre PP1 y PP2A, ejerciendo su acción a concentraciones nanomolares (Bito *et al.*, 1996).
- Ryanodina, Sigma ®: Inhibidor específico del receptor de ryanodina. Inhibe la señal rápida de calcio a concentraciones de 25 μM o mayores (Carrasco *et al.*, 2003).
- 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB), Sigma ®: Inhibidor del receptor de IP3. Inhibe la señal lenta de calcio a concentraciones 50 μM (Carrasco *et al.*, 2003).

Western Blot:

Membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (Immobilon-P) provistas por Millipore, Bedford, MA. El marcador de peso molecular preteñido y otros reactivos para la electroforesis fueron provistos por Bio-Rad.

Los anticuerpos utilizados fueron: Ac. policlonal de conejo anti-fosfoCREB, que detecta a CREB sólo cuando es activado por fosforilación del residuo serina 133 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), Ac. policlonal de conejo anti-CREB, que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada de CREB (Upstate Biotechnology UBI, Lake Placid, NY), Ac. policlonal de conejo contra las formas fosforiladas de ERK1 y ERK2 que reconoce las isoformas sólo cuando son activadas catalíticamente por fosforilación en treonina 202 y tirosina 204 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), Ac. policlonal de conejo anti-ERK2 , para niveles totales (Cell Signaling Technology, Beverly MA) y Ac. secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (HRP) (Pierce, Rockford, IL).

Determinación de actividad de calcineurina:

Se utilizó un kit para ensayo de actividad de calcineurina celular (Cellular Calcineurin Assay Kit Plus): Provisto por BIOMOL, AK-816 BIOMOL GREEN™ .

5.2 MÉTODOS:

Cultivo primario de músculo esquelético de rata:

Se utilizó el método descrito por Carrasco *et al.*, (2003) que es una combinación de diversas técnicas de la literatura. Se obtuvo tejido muscular de extremidades posteriores de ratas neonatas, Sprague Dawley (0-24 horas de vida). El tejido muscular fue disgregado y sometido a digestión enzimática con 0,2 % p/v de colagenasa en PBS, se filtró con nylon de poro de 41µm y el filtrado fue centrifugado a baja velocidad. Este filtrado se sembró en placas de 6 cm, manteniéndose en una incubadora a 37°C con 5 % de CO₂. Cuando los mioblastos comenzaron a alinearse, las células se trataron con citosina arabinosido 10 µM por 24 horas, para disminuir los fibroblastos. En estas condiciones se obtuvo miotubos bien formados y con actividad contráctil espontánea a los 6-7 días, tiempo en que se realizaron los experimentos. Se usó al menos 3 cultivos primarios independientes por experimento. Cada experimento requirió al menos 16 placas, de cada uno de los 3 cultivos primarios.

Despolarización:

1. Estimulación con potasio:

El medio de cultivo se aspiró de las placas y las células se incubaron en medio fisiológico de reposo durante 30 minutos, el que contenía: 118 mM de NaCl, 3 mM de CaCl₂, 1,2 mM de MgCl₂, 10 mM de glucosa, 20 mM de HEPES/Tris y una concentración de 4,7 mM de KCl. Luego se retiró el medio de reposo y se incubó las células con 1,5 ml de medio de despolarización, medio que contenía 38,7 mM de NaCl, 3 mM de CaCl₂, 1,2 mM de MgCl₂, 10 mM de glucosa, 20 mM de HEPES/Tris y una concentración de 84 mM KCl. Cada experimento consistió en una serie control y una experimental.

En la serie control, los miotubos fueron despolarizados en tiempos de 0, 5, 10 y 30 minutos, utilizando duplicados de cada uno de estos tiempos para obtener mayor

precisión en los datos, además se adicionó a esta serie un duplicado de tiempos 0 sin despolarizar. Es importante considerar que el vehículo del inhibidor (dimetil sulfóxido (DMSO) o etanol, se agregó a esta serie control.

En la serie experimental se repitió este procedimiento en la presencia del inhibidor. Los experimentos con inhibidores requirieron de un periodo de preincubación. Por lo tanto, al periodo inicial de 30 minutos en medio de reposo, se agregó otro periodo equivalente en que las células fueron incubadas con el inhibidor en el medio de reposo (serie experimental) o con el vehículo (serie control) antes de despolarizar.

2. Estimulación eléctrica:

Al igual que en la estimulación con potasio, las células musculares esqueléticas fueron incubadas con medio de reposo durante 30 minutos, posteriormente este medio fue retirado e incubado nuevamente con 5ml de medio de reposo más el inhibidor a utilizar en el experimento.

Para obtener una estimulación eléctrica homogénea en todas las células de la placa de cultivo, se confeccionó un anillo plástico de un diámetro de alrededor de 5,8 centímetros, el cual quedó inserto dentro de la placa de cultivo (6cm de diámetro), quedando sumergidos dentro del medio de reposo (5ml) de la placa, 6 electrodos de platino espaciados cada 1 centímetro con polaridad alternada, los que se encontraron fijos en el anillo plástico. Este anillo tenía dos terminales que se conectaron a una unidad de estimulación en el cual se controló manualmente la frecuencia, intensidad y duración de cada pulso. Los pulsos fueron monitoreados mediante un osciloscopio.

Para la verificación de la efectividad de este sistema de estimulación, las células recibieron 400 pulsos a una frecuencia de 45 Hz durante 9 segundos, visualizándose la respuesta a este estímulo como contracción celular generalizada, la cual se observó mediante microscopia (Eltit *et al.*, 2004).

Estos electrodos fueron capaces de inducir una efectividad de contracción celular de más de un 85% en las células de la placa.

Luego de la estimulación a los distintos tiempos establecidos, las células fueron lisadas.

Lisis de células:

Después del tratamiento de despolarización, el medio fue retirado y las células fueron solubilizadas a 4°C en 0.1 ml de tampón de lisis que contenía 0,1% NP-40, inhibidores de proteasas y fosfatasas. De esta manera se solubilizó la membrana nuclear y se obtuvo un lisado que contenía elementos nucleares. Luego se sonicó durante un minuto para luego dejar agitando las muestras por 20 minutos en una cubeta con hielo a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron centrifugadas a 17.860 G (15.000 rpm) a 4°C durante 30 minutos para eliminar restos de células y elementos insolubles, obteniéndose un sobrenadante en el que se determinó la concentración de proteínas por el método de Hartree (Hartree, 1972). Los sobrenadantes se mantuvieron a – 20 °C hasta su utilización.

Western blot:

Los Western blot se realizaron para determinar el estado de fosforilación de las proteínas CREB y ERK, luego de un estímulo despolarizante en presencia y ausencia de los inhibidores mencionados.

Las proteínas de los lisados celulares se separaron por electroforesis en mini geles de 10% SDS-poliacrilamida, se cargó 70µg de proteína para determinar CREB y 20µg en el caso de ERKs. Luego estas proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF las cuales fueron lavadas con una solución de TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 2M) durante 15 minutos para luego ser bloqueadas en solución de TBS con 3 % de leche descremada por 1 hora, para luego ser incubadas con el anticuerpo primario (P-ERKs o P-CREB) durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente las membranas se dejaron agitando durante 20 minutos a temperatura ambiente para luego lavarlas durante 30 minutos con solución TBS. La incubación con anticuerpo secundario, conjugado con HRP se realizó durante 1 hora y 30

minutos a temperatura ambiente, para luego lavar las membranas nuevamente con solución TBS durante 30 minutos.

El HRP se reconoció con un kit de quimioluminiscencia aumentada de acuerdo a las condiciones del fabricante (Amersham Biosciences, UK). Cuyo resultado quedó fijado en el film, luego las bandas fueron analizadas densitométricamente a través del programa computacional Scion Image de NIH (<http://scioncorp.com>). Para analizar los efectos de los inhibidores, tanto para la serie control como para la serie con inhibidor se normalizaron los datos obtenidos por análisis densitométrico de cada muestra despolarizada con su control respectivo.

Determinación de actividad de calcineurina:

La actividad de esta fosfatasa se determinó con un kit comercial "BIOMOL GREEN CELLULAR CALCINEURIN ASSAY KIT PLUS", según el protocolo del fabricante. Brevemente, luego de realizados los experimentos, esto es, despolarización de miotubos de rata en cultivo primario en diferentes condiciones, las células fueron resuspendidas en 100µl de amortiguador de lisis (50 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM EGTA, 1mM DTT, 0,2% NP40, mezcla de inhibidores de proteasas). Las muestras fueron sonicadas por 1 minuto, y ultracentrifugadas 180000xg a 4°C por 45 minutos en una centrifuga Sorvall Combi. Se recuperó el sobrenadante, el cual fue guardado a -70°C. Se removieron los fosfatos libres desde los extractos utilizando la resina provista por el fabricante. Se cuantificó la cantidad de proteína por muestra mediante el método de Hartree (Hartree, 1972). Para la determinación de los niveles de actividad de calcineurina, se realizaron las siguientes actividades para cada muestra en una placa de ensayo para ELISA: Actividad basal: 20µl H₂O + 25µl amortiguador de ensayo 2X con calmodulina. Actividad fosfatasa total: 10µl H₂O + 25µl amortiguador de ensayo 2X con calmodulina. Actividad fosfatásica sin calcineurina: 10µl H₂O + 25µl amortiguador de EGTA. Se agregó a cada actividad 10µl de sustrato fosfopéptido (sustrato compuesto de 17 aminoácidos, que contiene al aminoácido serina fosforilado) excepto para la actividad basal, y se

incubó a 30°C por 10 minutos. Se agregó 5 µg de extracto de proteínas desde cada actividad, y se incubó por 30 minutos a 30°C. Para detener la reacción se adicionaron 100µl de reactivo BIOMOL GREEN, y se les permitió desarrollar coloración verde por aproximadamente 30 minutos. La reacción colorimétrica se cuantificó mediante un espectrofotómetro, en el cual se leyó la densidad óptica a 620nm en un lector de placa ELISA. Para determinar la actividad calcineurina se utilizó la siguiente formula $CaN = Total - EGTA$ amortiguador. A la actividad fosfatásica total se le restó la actividad del extracto debida a fosfatasas tipo PP1 y PP2, de tal manera que se obtuvo la actividad debida solamente a calcineurina.

Determinación de la actividad de calcineurina con respecto a las dos señales de calcio:

Para la determinación de la actividad de calcineurina con respecto a las dos señales de calcio, las células fueron incubadas con los inhibidores específicos de cada señal, 2-APB en el caso de inhibir la señal lenta de calcio y ryanodina en el caso inhibir la señal rápida. Luego se procedió de la misma forma antes descrita, despolarización de miotubos y luego determinación de la actividad.

Estadística:

Cada experimento se realizó con un mínimo de tres determinaciones independientes. Esto significa que cada uno se realizó con miotubos provenientes de cultivos separados. Como en cada cultivo se analizaron muestras control y experimentales, las muestras se analizaron estadísticamente como muestras pareadas. Se utilizó el test de Student para muestras pareadas, y ANOVA seguido del post-test de Dunnett para comparar muestras experimentales con el control sin estimular. Para este efecto dispusimos de los programas computacionales Graph Prizma y Sigma Plot.

6. RESULTADOS

6.1 Activación de CaN por estimulación con K⁺.

Calcineurina (CaN) es una fosfatasa de serinas y treoninas activada por calcio, que se encuentra presente en una gran variedad de modelos celulares, y que es capaz de generar cambios a nivel de la expresión génica, ya que actúa sobre factores de transcripción. Resulta importante por lo tanto determinar, la actividad de CaN en nuestro modelo celular, células musculares esqueléticas de rata en cultivo primario sometidas a despolarización.

Con la finalidad de generar la activación de CaN en nuestro modelo, las células fueron estimuladas con dos estímulos distintos. El primer estímulo utilizado para despolarizar las células fue K⁺.

Con los análisis obtenidos mediante la utilización de ANOVA y Dunnett, se puede concluir que existe un aumento significativo a los 0,5, 1 y 5 min de despolarización, con respecto al control sin estimular.

Se observa por lo tanto la activación de CaN con el estímulo de K⁺, con un máximo al minuto de estimulación (Figura 11).

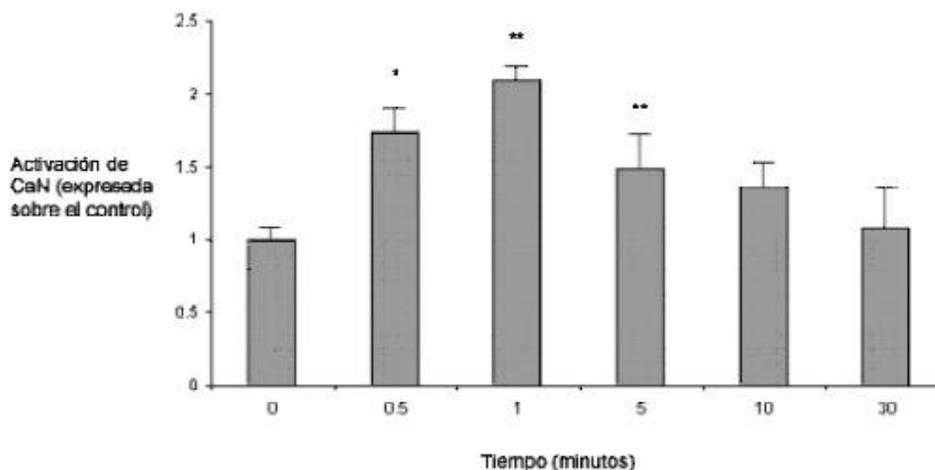


Figura 11. Activación de CaN por estimulación con K⁺. Los valores presentados fueron obtenidos de 4 experimentos. * P < 0,05, ** P < 0,001

6.2 Activación de CaN con estimulación eléctrica (E.E)

Siguiendo al experimento anterior, se utilizó un segundo estímulo, el eléctrico, para determinar si éste era capaz de activar a CaN.

Con los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA y Dunnett, se puede concluir que se observa un aumento significativo en los tiempos 1, 5 y 10 min, de despolarización con estimulación eléctrica, valores de actividad que se expresan sobre el control de CaN sin estimular.

En los tiempos 0,5 y 30 min no se observaron diferencias significativas con respecto al control sin estimular.

Por lo tanto se puede concluir que CaN se activa con estimulación eléctrica, con un máximo a los 5 minutos de estimulación (Figura 12).

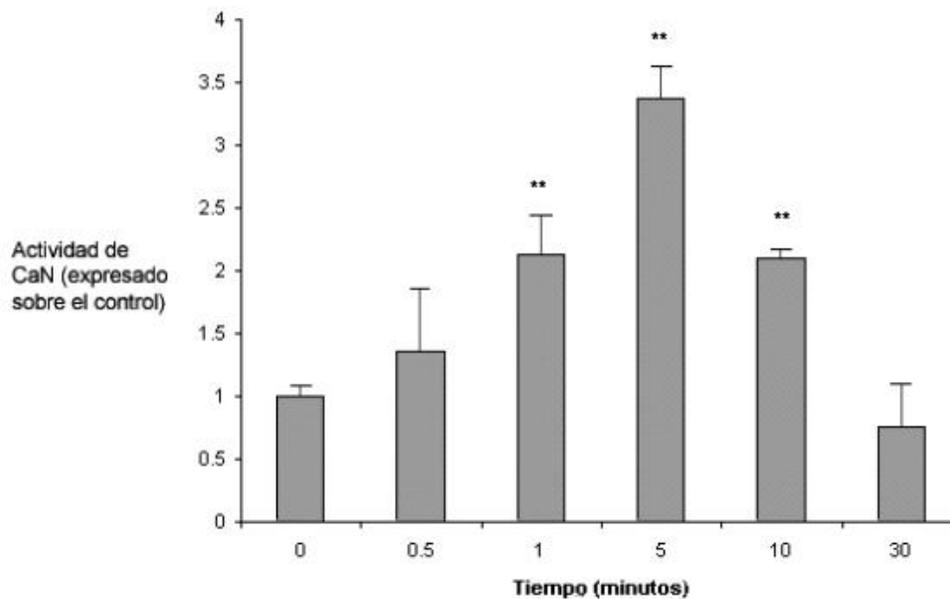


Figura 12. Activación de CaN por estimulación eléctrica. Los valores mostrados corresponden a 4 experimentos. ** $P < 0,001$.

6.3 Estudio del efecto de la señal rápida en la activación de CaN con estimulación eléctrica

La despolarización de células musculares esqueléticas inducida por K^+ o por estímulo eléctrico, resulta en un aumento de calcio intracelular que puede ser separado en 2 componentes. Como hemos mencionado anteriormente, hay una señal rápida de calcio generada por actividad de receptores de ryanodina, y una señal lenta mediada por receptores de IP3. Dada la dependencia de calcio de CaN, surge la pregunta de cual de las dos señales de calcio, la rápida asociada al receptor de ryanodina y al acoplamiento excitación-contracción, o la señal lenta asociada al receptor de IP3 y a cambios a nivel de la expresión génica, o ambas, son las que actuarían activando a esta fosfatasa.

Para determinar si la señal rápida tiene algún efecto sobre la activación de CaN en nuestro modelo celular, se utilizó ryanodina, inhibidor específico del receptor de ryanodina.

Se concluye con los resultados obtenidos, mediante la utilización del t de Student, que no existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental, que fue preincubado con ryanodina, por lo tanto la señal rápida no sería requerida para la activación de CaN, mediante la estimulación eléctrica, (Figura 13).

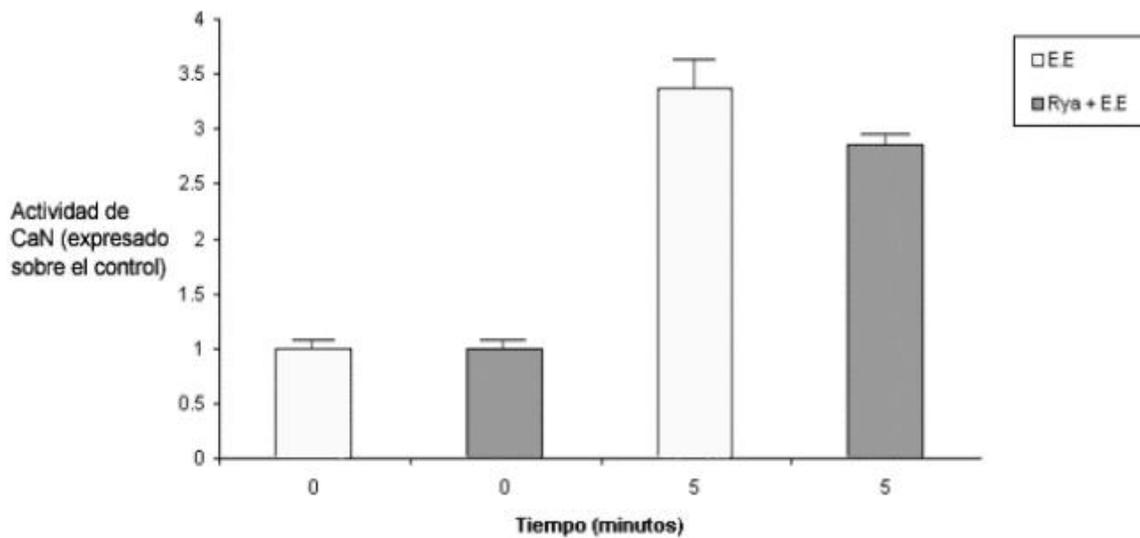


Figura 13. Efecto de ryanodina 25 μ M sobre CaN en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico. Los valores mostrados corresponden a 4 experimentos. El tiempo de 5 min se estableció durante el estudio de la cinética de activación de CaN con estímulo eléctrico, ya que se determinó que en este tiempo, se encontraba su máxima activación.

6.4 Estudio del efecto de la señal rápida en la activación de CaN utilizando como estímulo K^+

El estudio del calcio requerido para la activación de CaN, se realizó también en miotubos despolarizados con K^+ .

Los resultados analizados con el t de Student, indican que existe una disminución significativa de la actividad de CaN en ausencia de la señal rápida, por lo tanto la señal rápida contribuye a la activación de CaN, frente a la estimulación con K^+ (Figura 14).

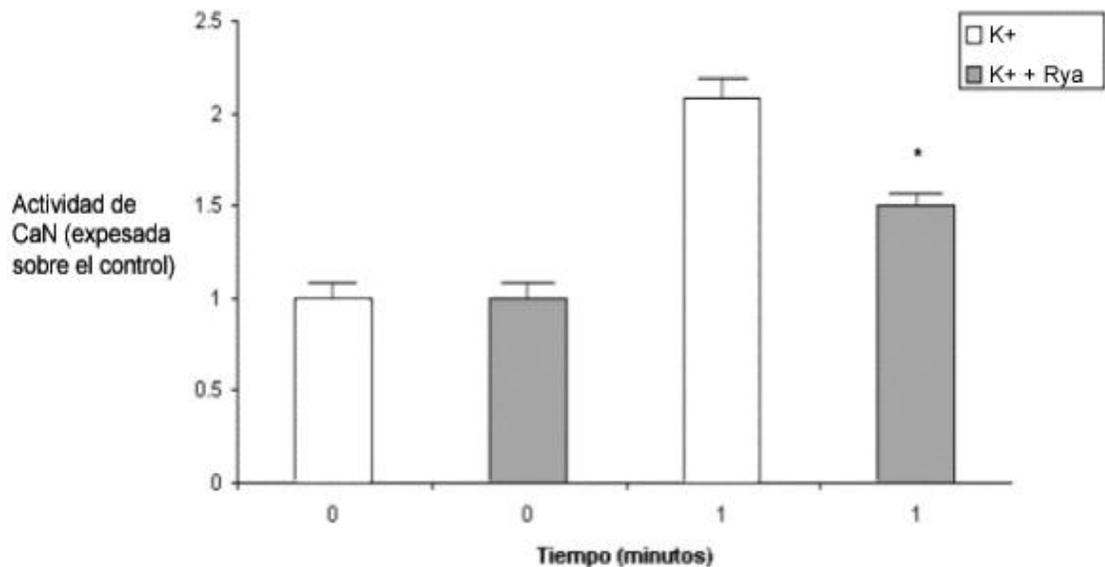


Figura 14. Efecto de ryanodina 25 μ M sobre CaN en miotubos despolarizados con K^+ Los valores mostrados corresponden a 6 experimentos. El tiempo 1 min de despolarización se estableció en el estudio de la cinética de activación de CaN con K^+ , en el cual su máxima activación era al minuto. * $P < 0,05$

6.5 Estudio del efecto de la señal lenta en la activación de CaN, utilizando K⁺ como estímulo

Para determinar si la señal lenta, asociada al receptor de IP3 tenía algún efecto sobre la activación de CaN, se inhibió la señal lenta de calcio con el inhibidor 2-APB.

Los resultados de este experimento muestran que existe una disminución significativa en la actividad de CaN, al inhibir la señal lenta, se puede concluir por lo tanto que la señal lenta contribuye a la activación de CaN, utilizando K⁺ como estímulo (Figura 15).

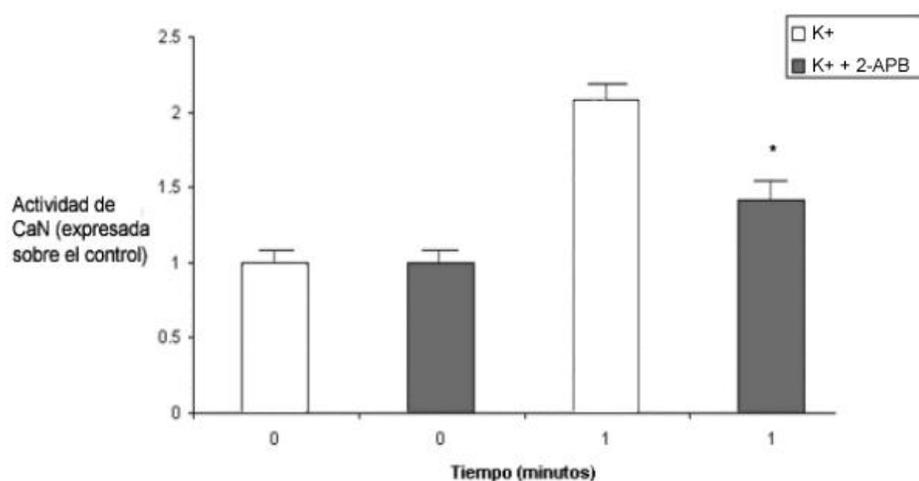


Figura 15. Efecto de 2-APB 50μM sobre CaN en miotubos despolarizados con K⁺ Los valores mostrados se obtuvieron de 6 experimentos. * P < 0,05

6.6 Efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de CREB fosforilado

La utilización de altas concentraciones de potasio en miotubos, induce dos liberaciones de calcio. Una primera liberación rápida de calcio, asociada al receptor de ryanodina y al fenómeno de excitación-contracción y una segunda liberación más tardía, asociada al receptor de IP3 y a la activación de factores de transcripción, como son CREB y a quinasas dependientes de calcio como son ERK1/2.

Como hemos descrito anteriormente la utilización de la estimulación eléctrica, sobre células musculares esqueléticas, resulta en el mismo fenómeno, la inducción de ambas señales de calcio. Sin embargo no se ha estudiado si además de la inducción de ambas señales, la estimulación eléctrica es capaz de generar activación de CREB y ERK1/2.

Los resultados obtenidos en este experimento nos indican que aunque se observa un aumento de los niveles de P-CREB con la estimulación eléctrica, el análisis estadístico de ANOVA y Dunnett no indicó diferencias significativas entre el control sin estimular y los demás valores (Figura 16).

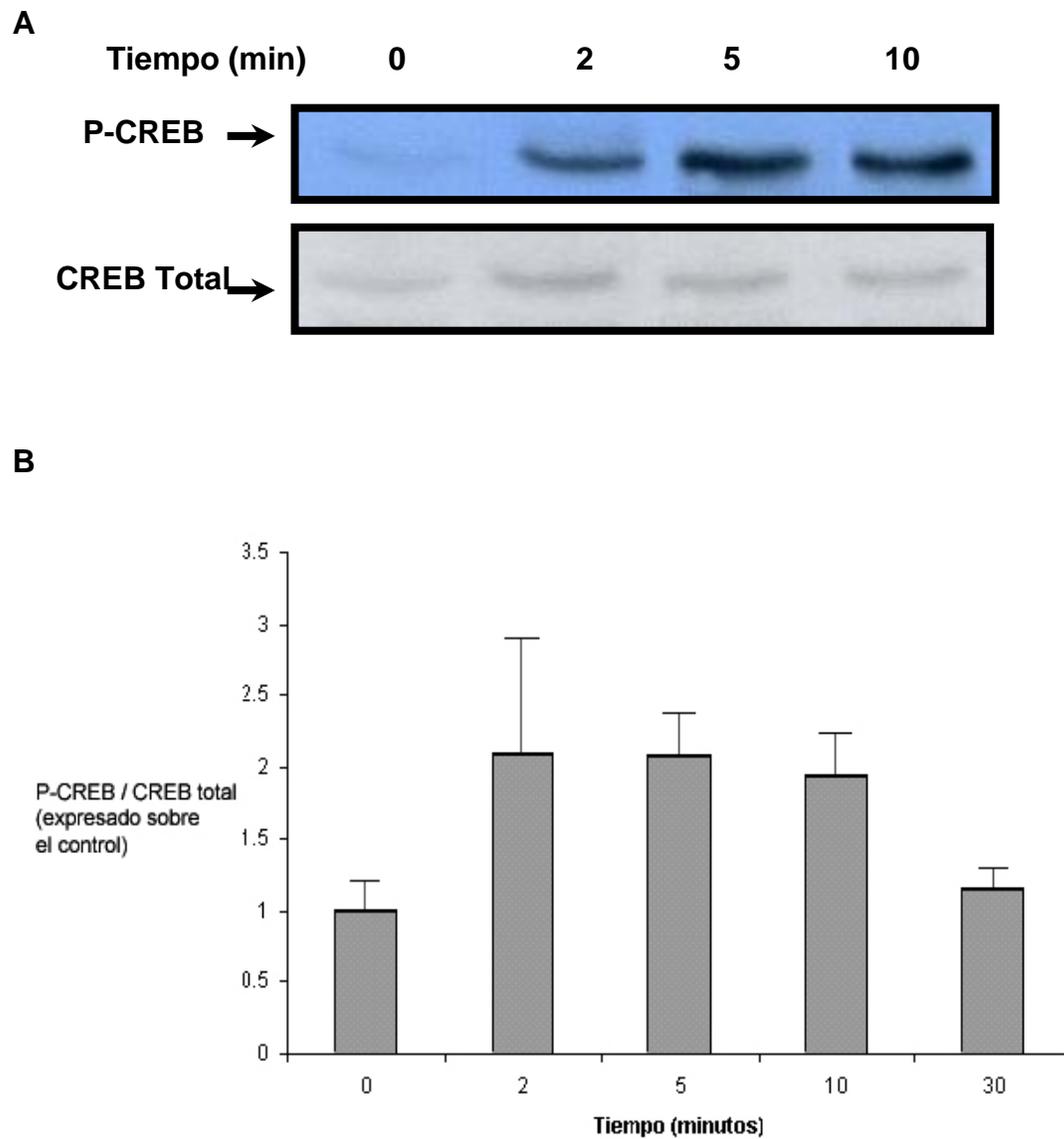


Figura 16. Efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de CREB fosforilado. A. Western blot de P-CREB y CREB total de un experimento representativo. **B.** Los valores mostrados fueron obtenidos de 5 experimentos.

6.7 Efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2

Para estudiar la activación de ERKs, las células en cultivo primario se despolarizaron con corriente.

Utilizando el análisis estadístico de ANOVA y Dunnett, se concluyó que existe un aumento significativo en los tiempos 2, 5 y 10 min para ERK1 y 5 min para ERK2, con respecto al control sin estimular (Figura 17).

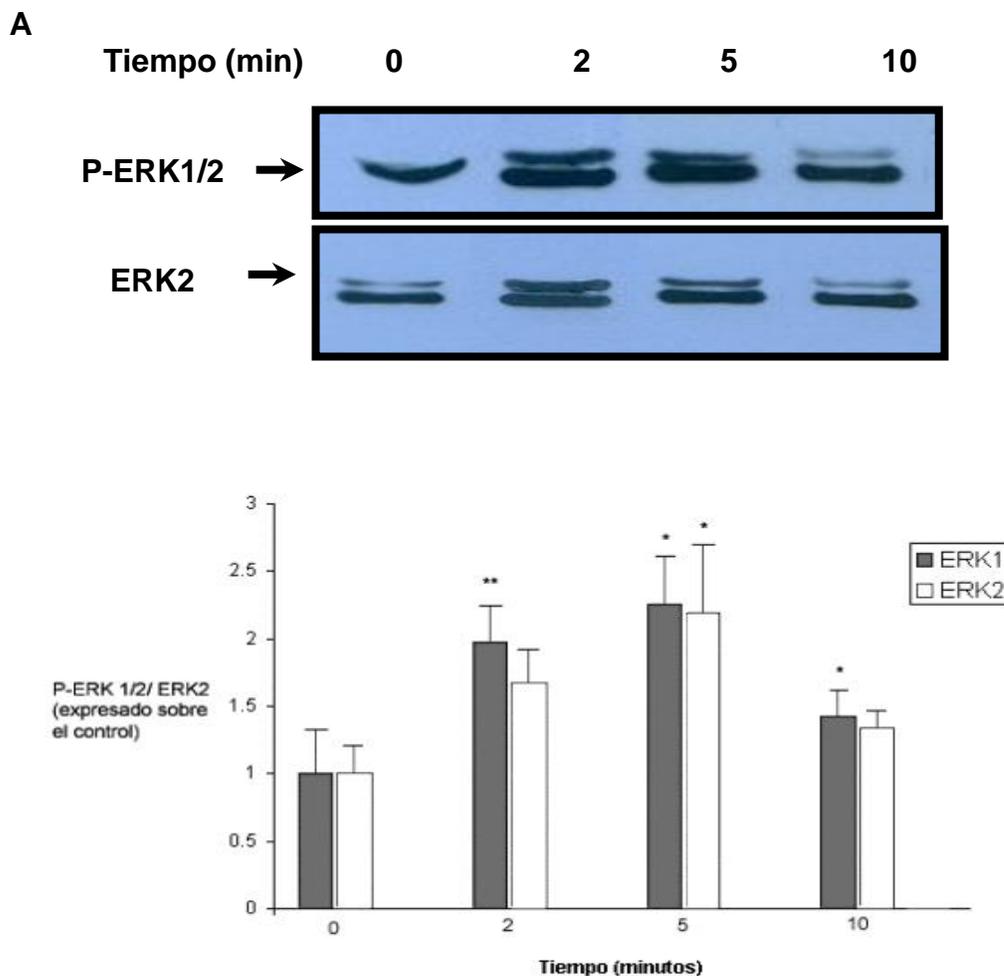


Figura 17. Efecto de la estimulación eléctrica sobre los niveles de ERK1/2 fosforilado. A. Western blot de P-ERK1/2 y ERK2 de un experimento representativo. **B.** Los valores mostrados fueron obtenidos de 6 experimentos.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$

6.8 CaN participa en la desfosforilación de P-ERK2 en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico

Como se ha indicado en la introducción CaN actúa desfosforilando a P-ERK1/2 en una variedad de modelos celulares.

Con los antecedentes que tenemos que CaN se activa en nuestro modelo celular, se realizaron experimentos para determinar si CaN participa en la desfosforilación de ERK1 y 2, en cultivos primarios de células musculares esqueléticas. Para esto se utilizó un inhibidor específico de CaN, ciclosporina A (CsA).

Mediante la utilización del t de Student, con los resultados obtenidos se puede concluir, que existe un aumento significativo de la fosforilación de ERK2 con respecto a al grupo control, al utilizar estimulación eléctrica. Por lo tanto CaN contribuye a la desfosforilación de ERK2 en nuestro modelo celular (Figura 18).

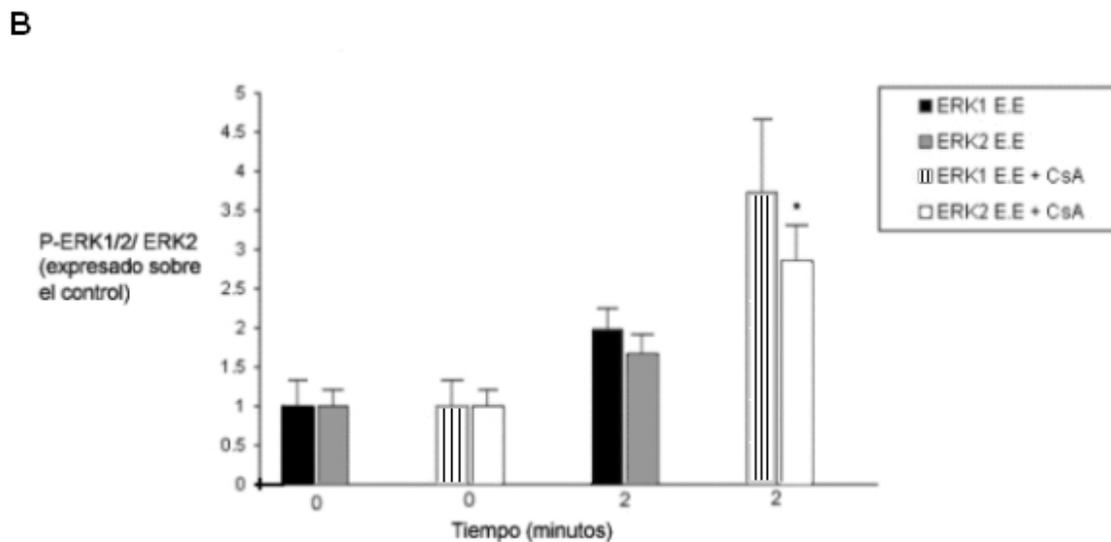
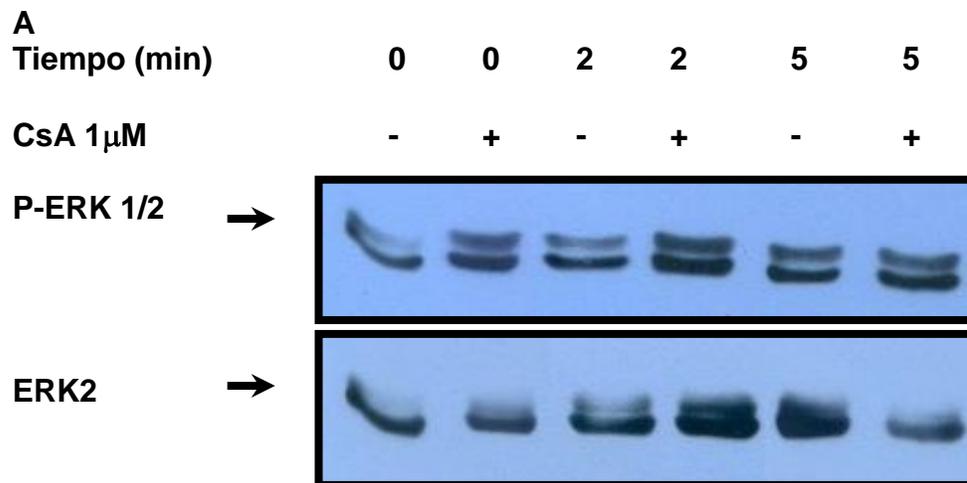


Figura 18. Efecto de ciclosporina A (CsA) 1 μ M sobre ERK1/2 en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico. A. Western blot de P-ERK1/2 y ERK2.

B. Los valores mostrados fueron obtenidos de 4 experimentos. Se realizaron experimentos utilizando variadas concentraciones: 1, 10, 100, 250nM y 1 y 5 μ M. Finalmente se utilizó la concentración de 1 μ M de CsA. * **P < 0,05**

6.9 CaN participa en la desfosforilación de P-CREB en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico

La participación de la fosfatasa CaN sobre el factor de transcripción CREB se conoce especialmente en neuronas. Para el estudio en células musculares se utilizó una metodología similar a la utilizada para analizar el efecto de CaN sobre ERK1/2.

Mediante la utilización del t de Student se concluye con los resultados obtenidos, que existe un aumento significativo de P-CREB al inhibir la actividad de CaN, con la utilización del estímulo eléctrico. Por lo tanto CaN participa en la desfosforilación de P-CREB, en células musculares esqueléticas (Figura 19).

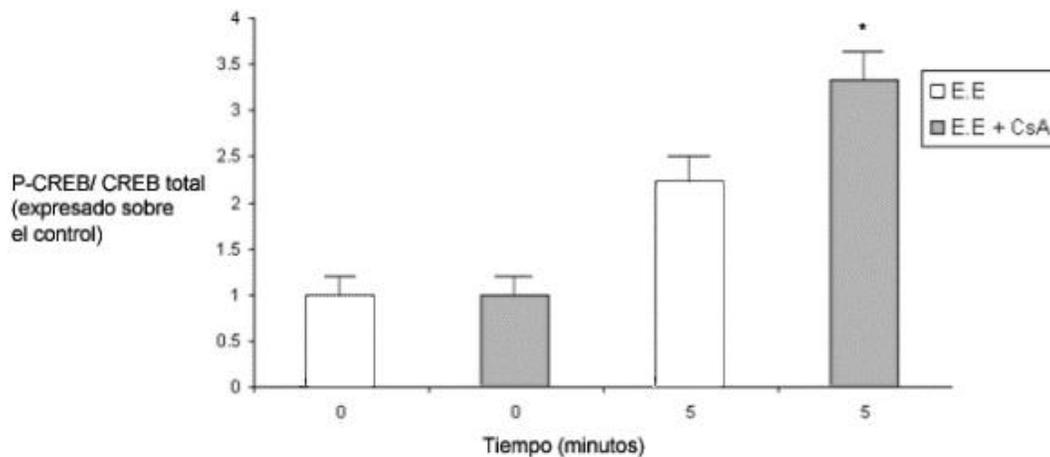


Figura 19. Efecto de CsA 1 µM sobre CREB en miotubos despolarizados con estímulo eléctrico. Los valores mostrados se obtuvieron de 6 experimentos.

En cada uno de ellos se usaron los valores de P-CREB sobre CREB total y se expresaron en relación a su control. El análisis estadístico se hizo en función del tiempo 5 min. * $P < 0,05$

6.1.0 Efecto de la inhibición de CaN sobre los niveles de fosforilación de CREB en miotubos despolarizados con K⁺

En este trabajo se profundizó el estudio de CaN sobre CREB con estímulo eléctrico, por este motivo se presentan 2 experimentos con despolarización con potasio.

Resultados preliminares nos indican que no se puede realizar análisis estadístico con estos experimentos, pero sí se puede calcular un promedio y la tendencia. El promedio obtenido de la serie control es de 2,46 y el de la serie experimental es de 3,43.

Con esto se puede concluir que en la serie experimental se observa un aumento que representa un 40% por sobre la serie control, existiendo una tendencia al aumento de la fosforilación de P-CREB, en ausencia de actividad de CaN.

6.1.1 La inhibición de PP2A, no altera la desfosforilación de CREB, en miotubos despolarizados con K⁺

Como fue mencionado anteriormente la activación de CREB es reflejo de la actividad de quinasas y fosfatasa. Quinasas que son capaces de fosforilar al factor transcripcional CREB y fosfatasa que actúan a la inversa, desfosforilándolo.

Una de las fosfatasa de interés en nuestro estudio es la proteína fosfatasa 2A (PP2A). La importancia de esta radica en la acción de PP2A sobre P-CREB, acción que ha sido descrita ampliamente en muchos modelos celulares, no así en el nuestro. Otra razón por la cual nos parece de importancia su estudio, es por su aparente activación por el ión calcio.

Con el objeto de determinar si PP2A tiene efecto sobre la desfosforilación de P-CREB, en cultivo primario de rata, en células musculares esqueléticas, se hicieron los estudios correspondientes para los cuales se utilizó un inhibidor de la PP2A. Todos los experimentos realizados utilizando OA, fueron estimulados con K⁺. El estímulo eléctrico será utilizado en estudios posteriores.

Los resultados obtenidos, mostraron que no existen diferencias significativas entre el grupo control y el experimental, mediante la utilización del t de Student (Figura 20).

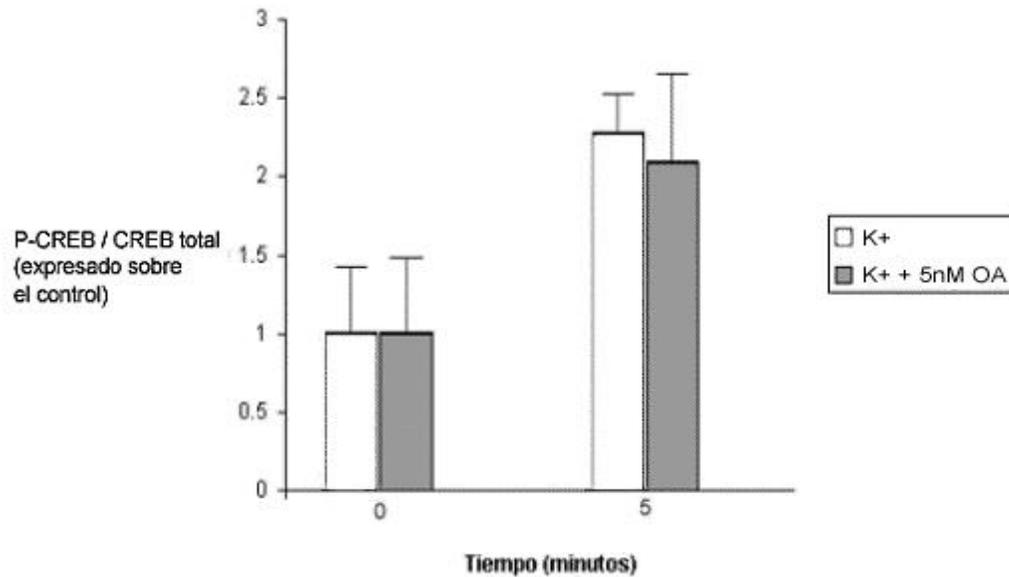


Figura 20. Efecto del ácido okadaico (OA) 5nM sobre el nivel de fosforilación de CREB en miotubos despolarizados con K^+ Los valores mostrados fueron obtenidos de 3 experimentos. En cada uno de ellos se usaron los valores de P-CREB sobre CREB total y se expresaron en relación a su control.

6.1.2 La inhibición de PP2A, no altera la desfosforilación de ERK1/2, en miotubos despolarizados con K⁺

Con la finalidad de determinar si PP2A tenía algún efecto sobre la quinasa ERK1/2 se siguió la misma metodología del experimento con CREB.

De los resultados obtenidos utilizando el t de Student de muestras pareadas, se puede concluir que no existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental (Figura 21).

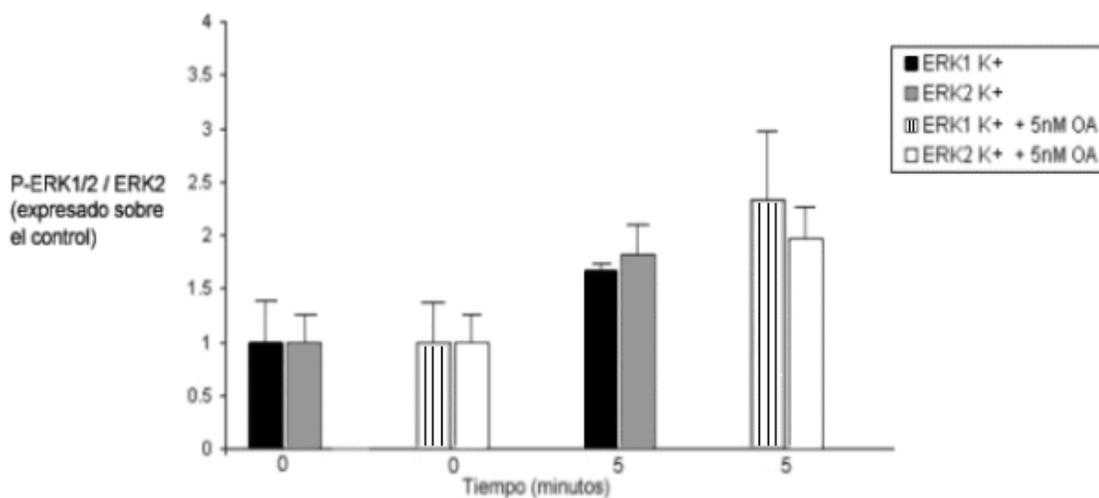


Figura 21. Efecto del ácido okadaico (OA) 5nM sobre ERK1/2 en miotubos despolarizados con K⁺ Los valores mostrados fueron obtenidos de 4 experimentos.

6.1.3 Efecto de PP1 sobre CREB y ERK1/2 en miotubos despolarizados con K⁺

Otra de las fosfatasas de interés en nuestro estudio es la PP1. Se encuentra presente en una gran variedad de modelos celulares, destacándose su participación en la desfosforilación de P-CREB a nivel de células neuronales, en donde PP1 se transloca desde el citoplasma al núcleo para desfosforilar directamente a P-CREB.

En otros trabajos se menciona el efecto que tiene la PP1 sobre la vía de activación de ERK1/2, por lo tanto teniendo estos antecedentes, resulta importante determinar como resultados complementarios a nuestros objetivos, si PP1 es capaz de actuar desfosforilando a estas proteínas CREB y ER1/2 en nuestro modelo celular, de cultivo primario de células musculares esqueléticas.

6.1.4 La inhibición de PP1 no altera significativamente la desfosforilación de ERK1/2

Aunque se aprecia una tendencia al aumento en ERK1, en el análisis de los resultados utilizando el t de Student, comparando el grupo control con el experimental, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos, sin embargo se podrían realizar más experimentos con el fin de observar si esta tendencia se hace significativa (Figura 22).

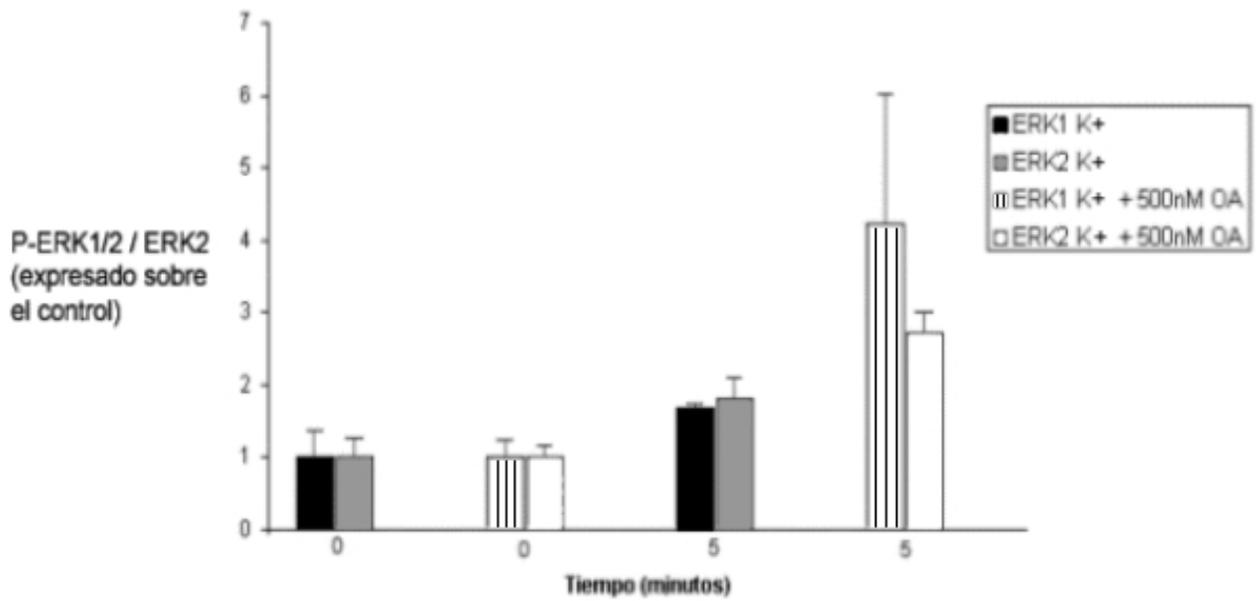


Figura 22. Efecto del ácido okadaico (OA) 500nM sobre el nivel de fosforilación de ERK1/2 en miotubos despolarizados con K^+ Los valores mostrados corresponden a 3 experimentos.

6.1.5 Efecto de PP1 sobre CREB

Con el fin de determinar si PP1 tenía algún efecto sobre P-CREB en nuestro modelo celular, se realizó un experimento siguiendo la misma metodología que para ERK1/2.

No se pudo analizar los datos, ya que la imagen obtenida en el Western blot, de la banda que corresponde a P-CREB en el tiempo 0 al igual que en el tiempo 5 min de la serie experimental se mostraron muy saturados, lo que imposibilitó el análisis de las bandas. La imagen obtenida del Western blot se muestra en una figura (Figura 23).

Para determinar si el fenómeno descrito en células musculares esqueléticas, con respecto al efecto del inhibidor ácido okadaico sobre los controles sin estimular, se daba particularmente es este modelo, se realizó un experimento con la línea celular neuronal, N2a.

No se observó una activación basal de los controles de P-CREB sin estimular, para la línea N2a en presencia del inhibidor. Lo que hace suponer que el aumento en la densitometría de las bandas de P-CREB es particular del modelo de células musculares esqueléticas.

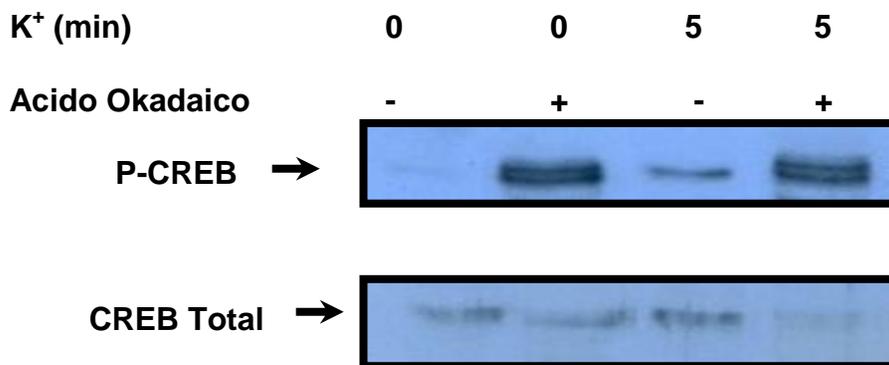


Figura 23. Efecto del ácido okadaico 500nM en el nivel de fosforilación de CREB en miotubos despolarizados con K⁺ Western blot de P-CREB y CREB total, este experimento se realizó en 4 cultivos diferentes de músculo esquelético con los mismos resultados.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se determinó que CaN, fosfatasa activada por calcio, es activada por despolarización de células musculares en cultivo, y su inhibición por ciclosporina A en una concentración de $1\mu\text{M}$ genera un aumento significativo en los niveles de P-CREB y P-ERK1/2.

Con respecto a las fosfatasas PP1 y PP2A, se pudo determinar mediante la inhibición de la PP2A con el inhibidor ácido okadaico en una concentración de 5nM , que esta fosfatasa no modifica los niveles de fosforilación de P-CREB y P-ERK1/2, en miotubos despolarizados con K^+ . Por otro lado, utilizando el mismo protocolo de despolarización, se determinó que la inhibición de PP1 no mostró diferencias significativas sobre los niveles de fosforilación de P-ERK1/2. Esto fue determinado utilizando ácido okadaico 500nM , concentración que inhibe a PP1.

7.1 Actividad de calcineurina

Mediante la utilización de un kit comercial se midió la actividad de CaN, los resultados mostraron que CaN es activada en nuestro modelo celular al utilizar dos estímulos despolarizantes diferentes, esta responde a ambos con una activación significativa.

La estimulación con K^+ activa a CaN, para lo cual se tomaron tiempos que van desde medio minuto de despolarización hasta los 30 min, observándose un peak de activación al minuto de despolarización. Una cinética distinta mostró la activación de CaN mediante la utilización de la estimulación eléctrica, con el estudio de los mismos tiempos utilizados con K^+ , se observó una máxima activación a los cinco minutos de despolarización.

Un aspecto importante de destacar es que la estimulación máxima de CaN de 1 y 5 min para la despolarización con K^+ y con estímulo eléctrico respectivamente, así como sus cinéticas completas, presentan un paralelo con la cinética de la señal lenta inducida por ambos protocolos, esto quiere decir, que en la medida que

aumenta la señal lenta de calcio hasta llegar a un punto máximo, aumenta también la activación de CaN alcanzando su máxima actividad en los tiempos antes descritos.

Al comenzar a disminuir la señal lenta de calcio, CaN comienza a inactivarse.

La dependencia de calcio de CaN se debe a su regulación por CaM y CaNB. Ambas proteínas presentan sitios de unión a calcio de alta afinidad en el rango 10^{-6} - 10^{-5} M, esta unión resulta en activación. A la concentración de calcio en reposo, 10^{-7} M, en cambio, ambas proteínas están inactivadas. De esta manera, por ser regulada por CaM y CaNB, la activación de CaN acompaña los cambios en calcio intracelular.

Otro aspecto es en relación al grado de activación de CaN. El estímulo eléctrico generó una mayor activación de CaN que el estímulo con alto K^+ , lo que sugiere que el nivel de calcio es mayor con la estimulación eléctrica. Aunque hay algunas indicaciones indirectas de que este sería el caso, no se ha medido aún en forma exacta la concentración de calcio bajo condiciones de estimulación eléctrica.

En síntesis ambos estímulos son capaces de generar la activación de CaN, pero mostrando cinéticas de activación muy distintas. La activación de CaN con ambos protocolos de despolarización fue descrita en otro modelo celular, en neuronas (Stemmer and Klee, 1994).

La activación de CaN como se ha indicado en la introducción es mediada por el ión calcio. En el laboratorio se ha determinado que las dos señales generadas por despolarización pueden ser inhibidas mediante la utilización de inhibidores específicos. Ryanodina actúa inhibiendo la primera liberación de calcio, que se desarrolla más temprana en el tiempo y 2-APB actúa inhibiendo la segunda liberación de calcio, aquella que es más tardía (Carrasco *et al.*, 2003).

Con los antecedentes de que CaN se activa en cultivo primario de células musculares esqueléticas, se procedió a determinar la participación de las dos señales de calcio en esta activación.

En células despolarizadas con K^+ , utilizando inhibidores farmacológicos específicos de las señales de calcio, 25 μ M de ryanodina para la señal rápida y 50 μ M de 2-APB para la lenta, se obtuvo disminución significativa de la actividad

de CaN. La inhibición observada con el bloqueo de la segunda señal de calcio fue levemente mayor que con la inhibición de la señal rápida. La determinación de una mayor participación de la señal lenta requeriría mayor número de experimentos, sin embargo, el papel de esta señal es también sugerido por los resultados sobre cinética de activación descritos más arriba.

CaN también se activó con el estímulo eléctrico, por lo que se midió el efecto de ryanodina como inhibidor de la señal rápida. Los cultivos despolarizados con estímulo eléctrico y en presencia del inhibidor ryanodina, no mostraron disminución significativa en la actividad de CaN a diferencia de la estimulación con K^+ .

El inhibidor 2-APB no fue utilizado con este estímulo, debido a que resultados preliminares en el laboratorio, demostraron que la segunda señal de calcio no era inhibida por 2-APB en presencia de estímulo eléctrico (comunicación personal JM Eltit).

7.2 CaN participa en la desfosforilación de P-CREB y P-ERK1/2 en células musculares esqueléticas despolarizadas con estímulo eléctrico

El factor de transcripción CREB ha sido muy estudiado a nivel neuronal ya que juega un rol esencial en diversos procesos que requieren de modificaciones en la expresión génica, incluyendo excitación de células nerviosas, proliferación de la pituitaria (Miyata *et al.*, 2001), memoria, aprendizaje y plasticidad sináptica (Bading, 2000). Además CREB cumple una función crítica en una variedad de procesos celulares, como son la proliferación, diferenciación y respuestas adaptativas.

Los resultados obtenidos al inhibir a CaN con $1\mu M$ de CsA, y ver su efecto sobre CREB y ERK1/2, nos indican que existe un aumento significativo en los niveles de fosforilación de ambas proteínas. Por lo tanto CaN participaría en la desfosforilación de estas, disminuyendo su actividad.

En nuestro estudio la activación de CaN disminuye la actividad de intermediarios clásicos de la expresión génica. CaN puede activar factores de transcripción como el NFAT, ampliamente estudiados en linfocitos T (Olson and Williams, 2000). En estas células CaN mediante desfosforilación, activa y transloca, desde citoplasma a núcleo, al factor de transcripción NFAT (factor nuclear de activación de células T), que activa genes necesarios para el funcionamiento de las células T. La utilización de drogas inmunosupresoras, como son ciclosporina A (CsA), FK506, por citar algunas en los organismos, inhiben a CaN, y por lo tanto la activación del factor NFAT, provocando inmunosupresión, causa por la cual se utilizan a nivel clínico, como terapia luego de un transplante de órganos (Olson and Williams, 2000).

Con respecto a ERK1/2, se describió que la inhibición de CaN mediante la utilización de CsA, mostró un aumento de su fosforilación al estimularse con corriente en nuestro modelo de células musculares esqueléticas, por lo tanto se puede concluir que CaN participaría desfosforilando a esta quinasa, disminuyendo su actividad. Estos resultados se contraponen a los descritos en cardiomiocitos, en los cuales, la estimulación generada por isoprotenerol (ISO) induce la activación de la quinasa ERKs y provoca hipertrofia. La utilización de CsA y FK506, inhibidores altamente específicos de CaN, permitieron observar una inhibición significativa de la activación de ERKs, y de la hipertrofia cardíaca, por lo tanto se concluyó con estos resultados que CaN, es requerida para la activación de ERKs (Zou *et al.*, 2001).

Como ya se ha nombrado anteriormente en nuestro modelo ERK1/2 actúa fosforilando a CREB (Carrasco *et al.*, 2003). Al observarse un aumento en los niveles de ERK1/2 y de CREB, al inhibir a CaN, una posibilidad de explicar esto sería que CaN actuara solamente sobre ERK1/2 y a su vez esta sobre CREB, es decir, que al inhibirse CaN, y activarse aún más ERK1/2, esta podría aumentar la fosforilación de CREB por su efecto de quinasa sobre este.

Otra posibilidad sería que CaN, actuara directamente sobre CREB y por otra vía de señalización lo hiciera sobre ERK1/2 o que CaN actuara indirectamente sobre

ERK1/2 y sobre CREB utilizando mediadores como lo hace en neuronas (Bito *et al.*, 1996).

En nuestro modelo de células musculares esqueléticas se ha descrito la activación de varios genes tempranos con la despolarización, efecto dependiente de la activación de CREB y ERK1/2 (Carrasco *et al.*, 2003). En base a los resultados de esta tesis será interesante estudiar los efectos sobre estos genes tempranos que provocaría el aumento de CREB y ERK1/2 mediado por la inhibición de CaN.

7.3 Efecto de PP2A y PP1 en CREB y ERK1/2 en células musculares esqueléticas despolarizadas con potasio

Resulta importante considerar otras fosfatasa como complemento a nuestro estudio. En particular PP2A y PP1 que se han descrito en muchos modelos celulares. El estudio de ambas fosfatasa se hizo de forma indirecta utilizando inhibidores, sin medirse su actividad propiamente tal en cultivos primarios.

PP2A cuya activación por calcio, fue descrita recientemente (Sim and Ludowyke, 2002) fue inhibida por OA 5 nM y se analizó el resultado de esta inhibición sobre los niveles de CREB y ERK1/2 fosforilados. Los resultados mostraron que PP2A, no modificó estas proteínas en nuestro sistema. En células PC12, en cambio, PP2A de localización nuclear, se ha descrito como una de las fosfatasa más importantes en la desfosforilación de P-CREB (Wadzinski *et al.*, 1993). También en condriocitos se ha demostrado que la inhibición de PP2A, por concentraciones nM de OA, incrementan los niveles de CREB fosforilado (Zakany *et al.*, 2002).

El mismo efecto se muestra sobre ERK1/2 en células NIH-3T3, en donde PP2A actúa sobre la cascada de activación de ERKs, ejerciendo su acción sobre Raf y MEK, desfosforilándolos (Bhalla *et al.*, 2002).

El estudio de inhibición de PP1 mediante la utilización de 500nM de OA, mostró un aumento de la fosforilación de ERK1/2, en particular de ERK1, que no fue significativo. Deben considerarse estos resultados como preliminares y realizar más experimentos para determinar con exactitud el efecto de PP1.

Estos resultados, aunque no significativos, difieren de los obtenidos en otro modelo celular utilizando otro inhibidor de PP1, tautomycin, el que suprime la activación de Raf, lo que resulta en la inactivación de MEK-ERK (Mitsubishi *et al.*, 2003).

En células PC12 se describe mediante la utilización de OA, que PP1 sería una de las proteínas fosfatasa que predominan en la desfosforilación de P-CREB (Hagiwara *et al.*, 1992). En nuestro modelo, mediante la utilización del mismo inhibidor, no se pudo analizar los resultados en los Western blot, debido a que los controles en tiempo 0, previamente incubados con OA sin estimular, mostraron una activación muy alta que no permitió analizar los resultados.

Para determinar si este fenómeno era causado por el inhibidor o era un fenómeno propio de las células musculares esqueléticas, se procedió a realizar el mismo experimento con otro modelo celular, con células N2a. En estas células no se observó el mismo resultado que con células musculares.

Estos antecedentes sugieren que PP1 estaría actuando en condiciones basales sobre CREB en células musculares esqueléticas y por ese motivo su inhibición en condiciones de no estimulación resultaría en un aumento muy alto de niveles de P-CREB. Para responder a esta pregunta será necesario continuar este estudio utilizando otro inhibidor de PP1 como la tautomycin, descrita muy recientemente (Mitsubishi *et al.*, 2003).

8. CONCLUSIONES

Los resultados de esta memoria de título indican que CaN se activa en nuestro modelo de células musculares esqueléticas frente al fenómeno de despolarización, mediante la utilización de estímulos como K^+ y estímulo eléctrico.

Se demuestra además que la activación de CaN por K^+ , requiere de la participación de los dos componentes de la señal de calcio, la señal rápida y la lenta.

La participación de CaN, en la desfosforilación de CREB y ERK1/2, en músculo esquelético, nos indica que esta fosfatasa es parte importante de esta vía de transducción de señales. Esto abre la posibilidad de continuar con estudios a futuro sobre el efecto que CaN puede producir a nivel de los genes tempranos, ya descritos en músculo esquelético, cuya activación es mediada por el factor de transcripción CREB. Es importante destacar que CREB, ERK1/2 y los genes tempranos son intermediarios que regulan la expresión de numerosos genes. Por lo tanto, es necesario conocer los mecanismos de transducción que los regulan.

Experimentos complementarios en relación a las fosfatasas PP2A y PP1, nos indican que PP2A no actúa sobre CREB y ERK1/2 en estas células cuando son despolarizadas. El efecto de PP1 sobre CREB no pudo ser determinado en nuestro modelo celular con el inhibidor OA; sin embargo se plantea la posibilidad de realizar experimentos a futuro utilizando un inhibidor recientemente descrito como es la tautomycin. Con respecto a PP1 y ERK1/2 se determinó que existe una tendencia al aumento de la fosforilación en particular de ERK1. Se requieren más experimentos para determinar en forma exacta el efecto de PP1 sobre esta quinasa.

9. ANEXO

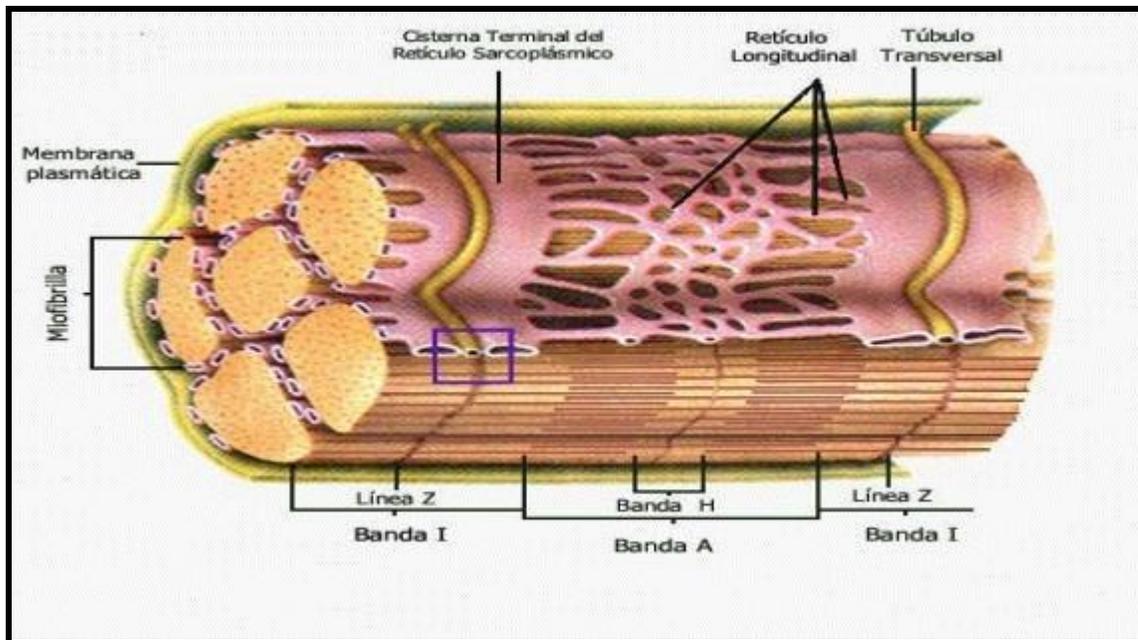


Figura 1. Esquema de miofibrilo. Miofibrilo que posee una membrana plasmática e invaginaciones de esta, formando los túbulos transversales o túbulos T, muy íntimamente ligados a la cisterna terminal del retículo sarcoplásmico (Modificado de libro Biochemistry, Voet , D and Voet , J, 1995).

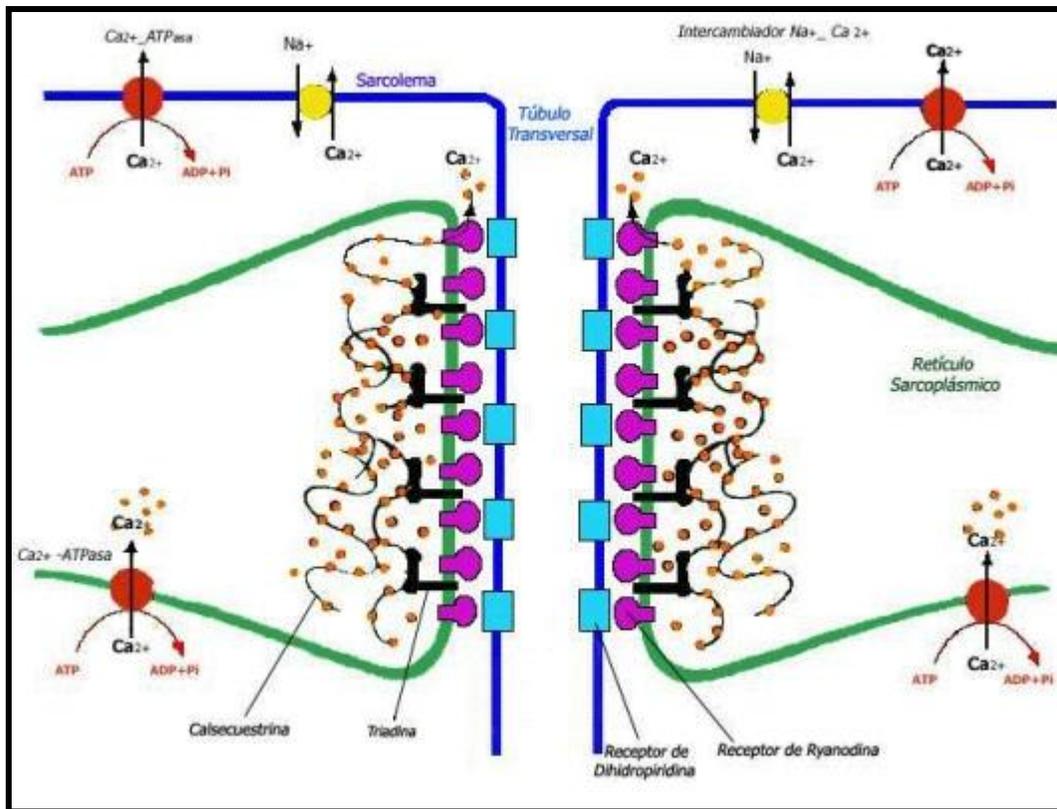


Figura 2. Elementos que participan en el acoplamiento excitación-contracción. Esquema en el que se pueden distinguir invaginaciones de membrana o túbulos T, en los que se encuentran los receptores de DHPR. Frente a la despolarización de membrana se activan y por cercanía física activan al receptor de ryanodina, ubicado en el retículo sarcoplásmico, provocando una liberación de calcio al citoplasma. Este aumento es transitorio rápido en el tiempo, aparece en un tiempo menor a 1 segundo y se relaciona con el proceso de contracción muscular (Diseñado por Dra. Marianela Beltrán).

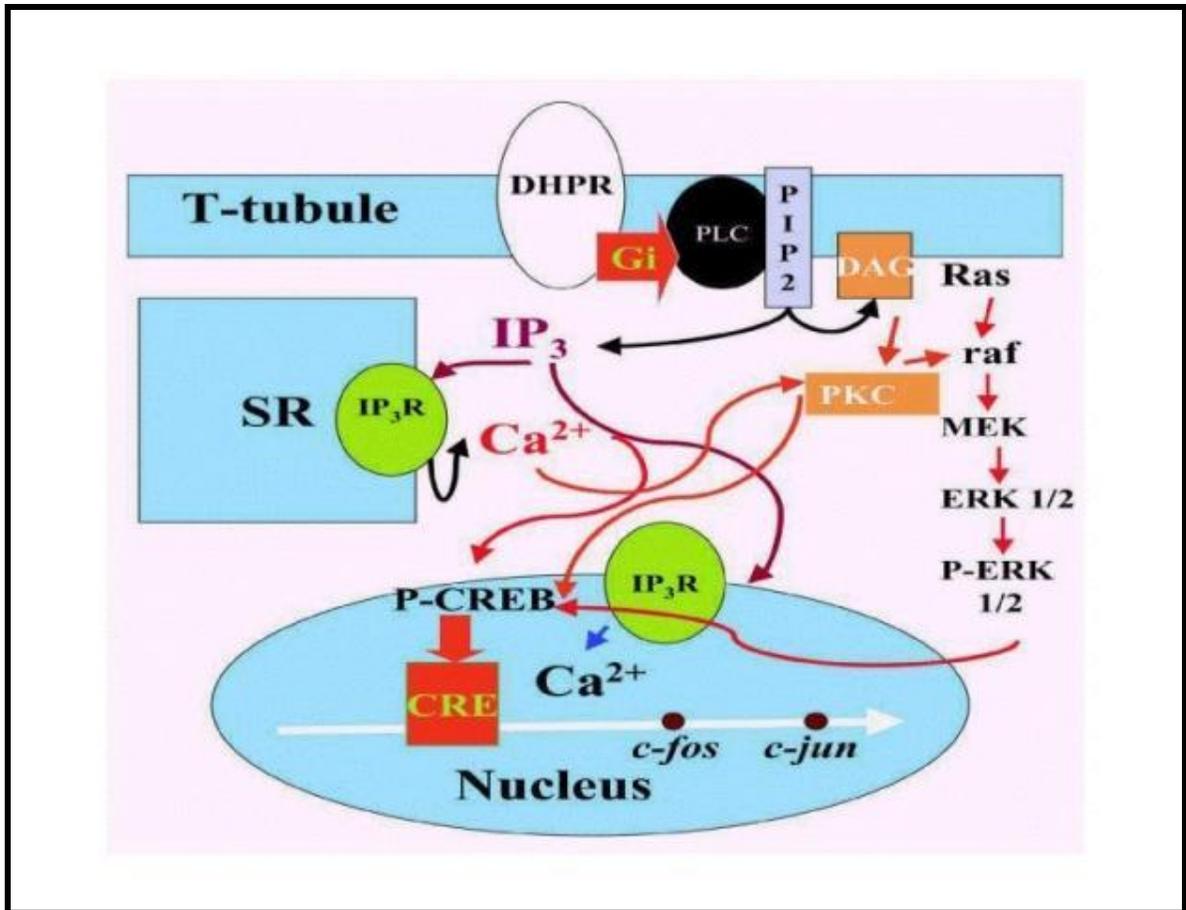


Figura 3. Mecanismo generador de la señal lenta de calcio. Esquema del efecto de despolarización de membrana en la célula muscular esquelética. Se produce la hidrólisis del PIP₂, generando IP₃ y DAG. IP₃ se unirá a su receptor, provocando la apertura de este y liberación de calcio tanto al citoplasma como al núcleo. Esta liberación de calcio estimula la activación CREB y de la vía de señalización de ERKs (Jaimovich and Carrasco, 2002).

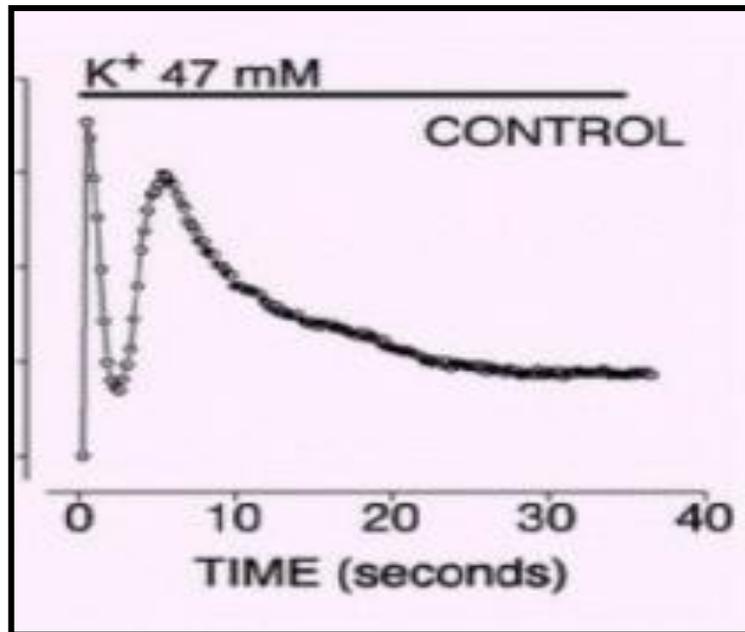


Figura 4. Señales de calcio en miotubos de rata despolarizadas con K⁺ Altas concentraciones de potasio externa (47mM) inducen las dos señales de calcio. Una señal rápida asociada al acoplamiento E-C que se observa en un tiempo menor a 1 segundo y una lenta que se presenta en un tiempo de alrededor de los 10 segundos, que incrementa el calcio en el citoplasma y núcleo (Powell *et al.*, 2001).

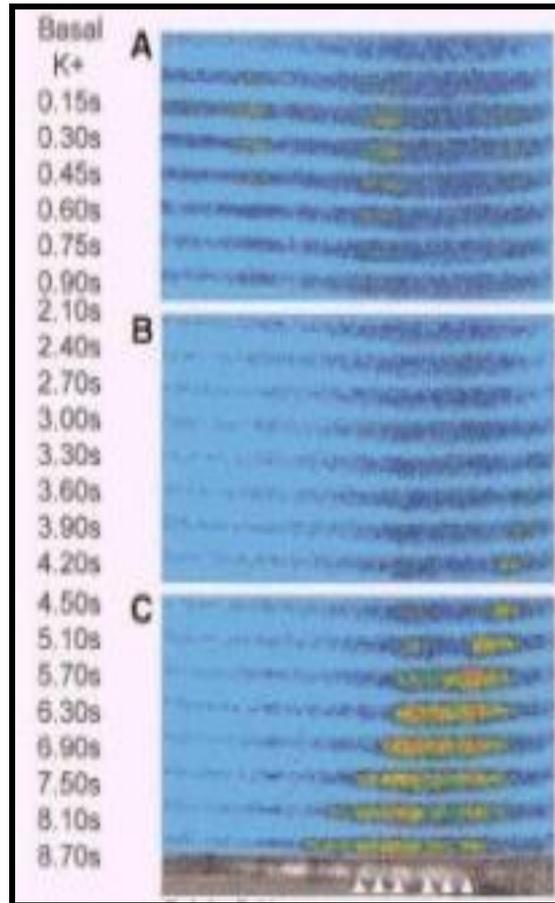


Figura 5. Imagen de calcio obtenida mediante la utilización de fluorescencia con fluo 3, por microscopia confocal en miotubos de rata. La imagen confocal muestra la disección de las 2 liberaciones de calcio. Un aumento rápido y otro lento en las concentraciones de calcio intracelulares. **A.** Se observa un aumento rápido de calcio, menor a 1 segundo. Esta liberación corresponde a la liberación rápida de calcio asociada al receptor de ryanodina. **B.** Se puede observar que aparece un foco de fluorescencia en el extremo derecho al acercarse a C alrededor de los 4.2s. **C.** Segunda liberación de calcio, más tardía en el tiempo y de mayor duración, relacionada con el receptor de IP3 (Jaimovich *et al.*, 2000).

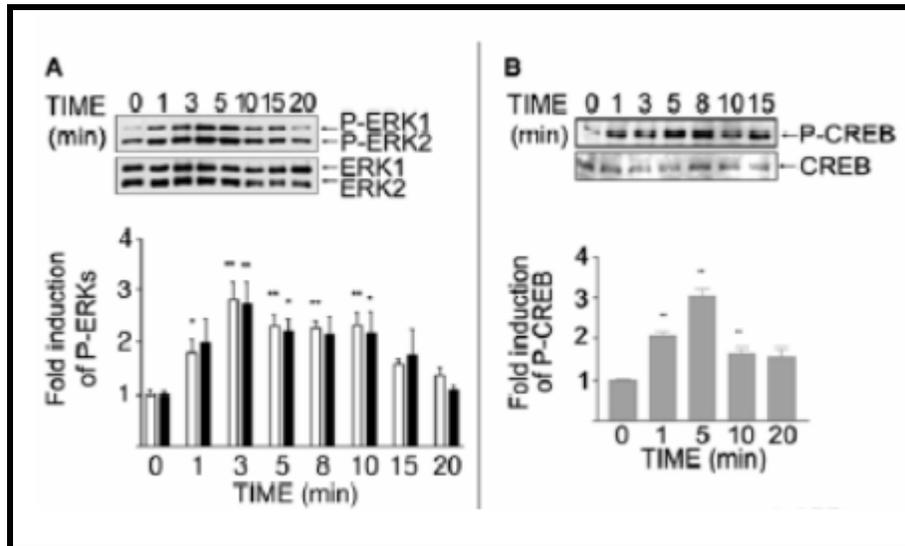


Figura 6. Efecto de K^+ sobre ERK 1/2 y CREB en cultivo primario de rata.

A1: Western blot de ERKs fosforilado y de ERK total, en los tiempos mencionados en presencia de K^+ . **A2:** Gráfico de barras que representa la inducción de la fosforilación de ERKs (expresada como ERKs fosforilado sobre ERKs total) en relación a los niveles del control. **B1:** Western blot de CREB fosforilado y CREB total, en los tiempos mencionados en presencia de K^+ . **B2:** Gráfico de barras que representa la inducción de la fosforilación de CREB (expresada como CREB fosforilado sobre CREB total) en relación a los niveles del control (Powell *et al.*, 2001).

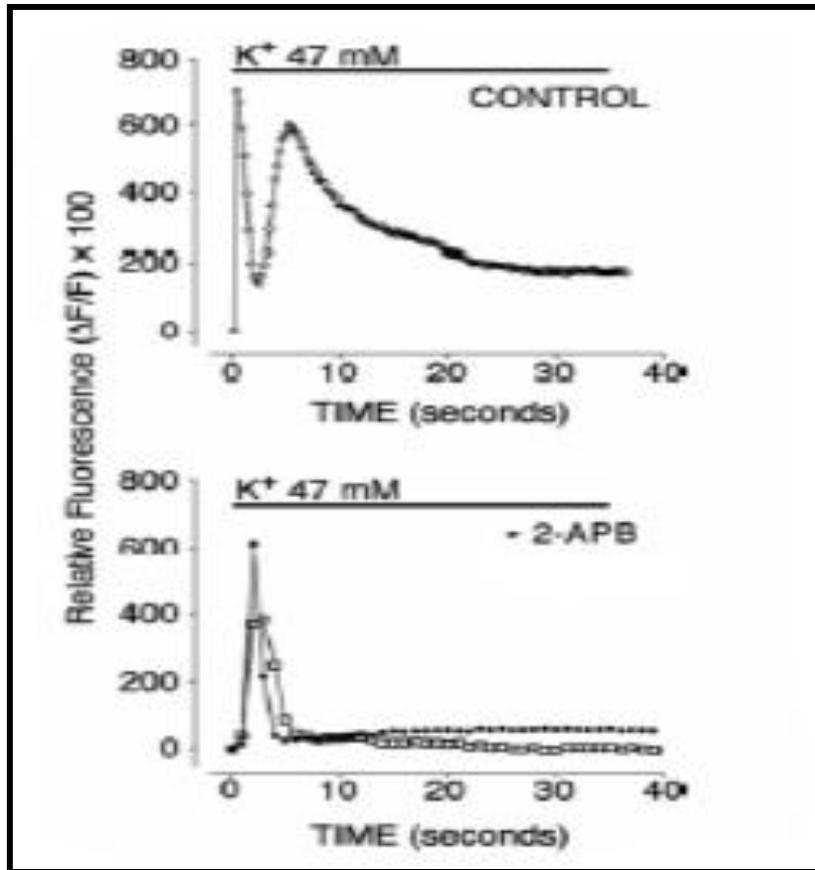


Figura 7. Efecto de 2-APB en las señales de calcio en miotubos de rata despolarizados con K⁺ Imagen superior: Miotubo en condiciones control; se evidencian los dos componentes de las señales de calcio mediante fluorescencia utilizando fluo-3. Se observa una señal rápida que aparece en un tiempo menor a 1 segundo y una segunda señal más tardía que corresponde a la señal lenta de calcio que aparece alrededor de los 8 segundos luego de la estimulación. Imagen inferior: Miotubo preincubado con 50μM de 2-APB y luego despolarizado con 47 mM de K⁺. Se observa que la segunda señal de calcio es completamente inhibida (Powell *et al.*, 2001).

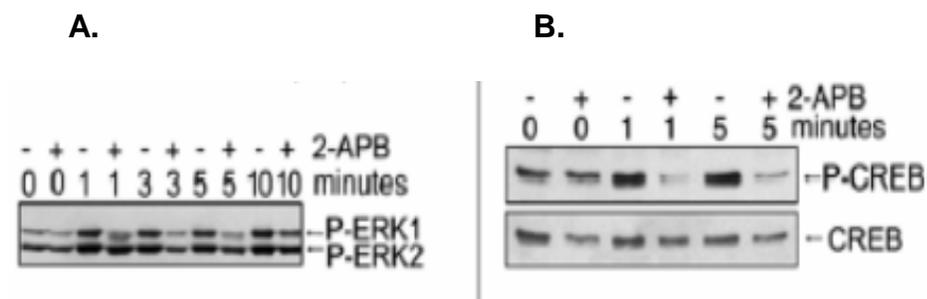


Figura 8. Inhibición de P-ERK 1/2 y P-CREB en células musculares esqueléticas despolarizadas en presencia del inhibidor de la señal lenta.

A: Western blot de P-ERKs y ERK total en miotubos despolarizados, en presencia y ausencia del inhibidor 2-APB. La desfosforilación de ERKs disminuye en presencia del inhibidor. **B:** Western blot de P-CREB y CREB total en miotubos despolarizados, en presencia y ausencia del inhibidor 2-APB. La fosforilación de CREB disminuye en la presencia del inhibidor (Powell *et al.*, 2001).

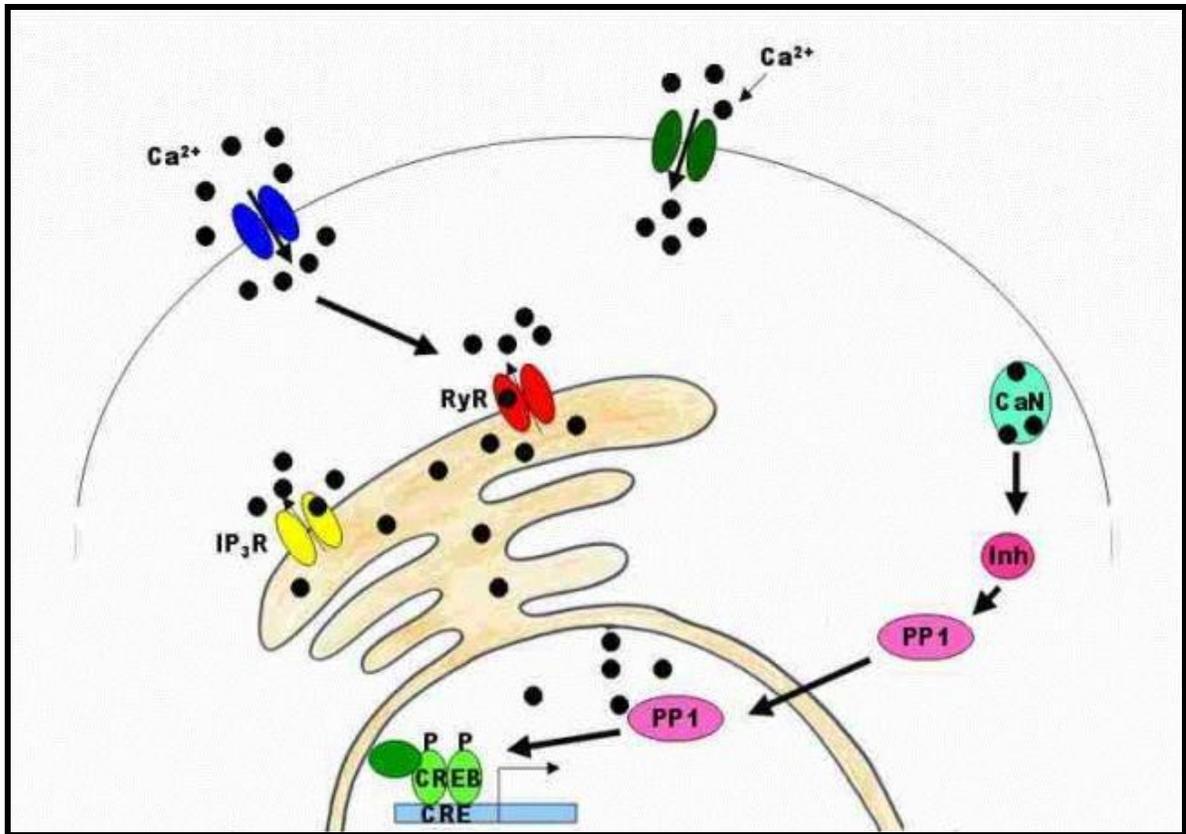


Figura 9. Activación de CaN en neuronas. Esquema de la activación de CaN, por Calcio-CaM y su efecto sobre la proteína I-1, en neuronas. CaN desfosforila a I-1 y esta deja de ejercer su efecto inhibitorio sobre PP1 activándola. PP1 se transloca al núcleo y desfosforila directamente a P-CREB (Diseñado por la Dra. Ulrique Kemmerling y Natalia Puentes).

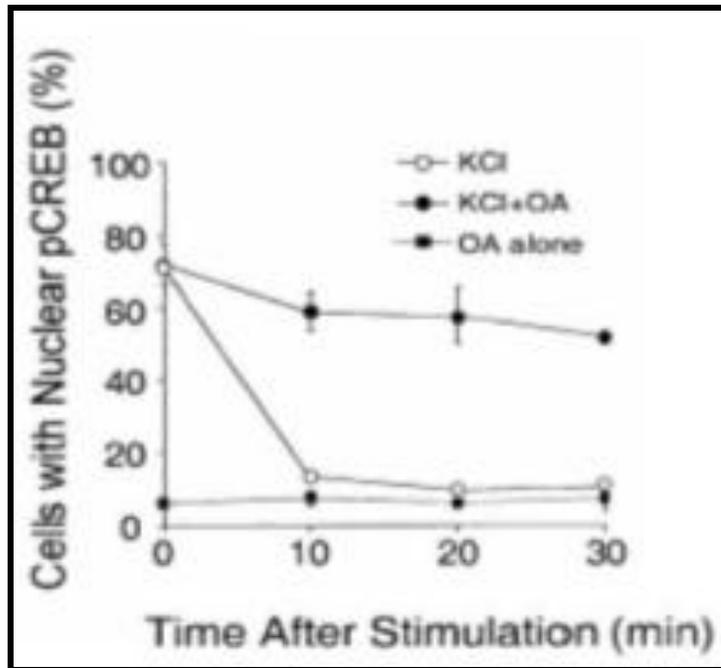


Figura 10. Efecto del ácido okadaico (OA) sobre la fosforilación de CREB en neuronas. En la curva superior se representa el efecto de la despolarización con K^+ en presencia del inhibidor OA, sobre los niveles de P-CREB.

En la curva central se observa solamente el efecto de despolarización sobre P-CREB y en la curva inferior se aprecia el efecto del inhibidor OA sobre los niveles P-CREB.

Frente al estímulo de despolarización del K^+ , el OA bloquea la desfosforilación de P-CREB a altas concentraciones ($2\mu M$), pero no a bajas concentraciones (20nM, no se muestra en la figura), esto indica que PP1 es requerida para la desfosforilación de P-CREB (Chang and Berg, 2001).

BIBLIOGRAFÍA

AHN, S; RICCIO, A; GINTY, D. 2000. Spatial considerations for stimulus-dependent transcription in neurons. *Annu Rev Physiol* 62:803-823.

ALBERT, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J, *Biología molecular de la célula*, 1994. 3º Edición, Cap 15, pág 741-794. Editorial Garland Publishing, Inc.

BADING, H. 2000. Transcription-dependent neuronal plasticity. The nuclear calcium hypothesis. *J Biol Chem* 267:5280-5283.

BERRIDGE, M.J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.

BHALLA, U; RAM, P; IYENGAR, R. 2002. MAP Kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitote-activated protein kinase signaling network. *Science* 297:1018-1023.

BITO, H.; DEISSEROTH, K.; TSIEN, R.W. 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: A calcium-and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87:1203-1214.

CÁRDENAS, C.; BUCHUK, D.; MÜLLER, M.; QUEST, A.F.G.; PÉREZ, F.; JAIMOVICH, E.; CARRASCO, M.A. 2002. La fosforilación de CREB es dependiente de PKC en células musculares esqueléticas en cultivo despolarizadas. In: XLV Reunión Anual Soc. Biología de Chile. Puyehue, Chile. Nov. 2002. R-67, Res. 1.

CARRASCO, MA; RIVEROS, N; RÍOS, J; MULLER, M; TORRES, F; PINEDA, J; LANTADILLA, S; JAIMOVICH, E. 2003. Depolarization-induced show calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1438-C1447.

CHANG, K AND BERG, D. 2001. Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron* 32:855-865.

COHEN, P. 1994. The discovery of protein phosphatases: from chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *Bioessays* 16:583-588.

DUNN, S.E.; SIMARD, A.; BASSEL-DUBY, R.; WILLIAMS, R.S; MICHEL, R.N. 2001. Nerve activity-dependent modulation of calcineurin signaling in adult fast and slow skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 276:45243-45254.

ELTIT, JM; HIDALGO, J; LIBERONA, JL; JAIMOVICH, E. 2004. Slow calcium signals after tetanic electrical stimulation in skeletal myotubes. *Biophys J* 86:1-10.

HAGIWARA, M; ALBERTS, A; BRINDLE, P; MEINKOTH, J; FERAMISCO, J; DENG, T; KARIN, M; SHENOLIKAR, S; MONTMINY, M. 1992. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 105-113.

HARTREE, E.F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427.

HERZIG, S AND NEUMANN J. 2000. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80:173-190.

HINDLEY, A AND KOLCH, W. 2002. Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci* 115:1575-1581.

JAIMOVICH, E.; REYES, R.; LIBERONA, J.L.; POWELL, J.A. 2000. IP3 receptor, IP3 transients, and nucleus-associated calcium signals in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C998-C1010.

JAIMOVICH, E AND CARRASCO, M.A. 2002. IP3 dependent calcium signals in muscle cells are involved in regulation of gene expression. *Biol Res* 35:195-202.

KLEE, C.; REN, H.; WANG, X. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273:13367-13370.

MELLSTROM, B.; NARANJO, J.R. 2001. Mechanisms of calcium-dependent transcription. *Cur Op Neurobiol* 11:312-319.

MITSUHASHI, S; SHIMA, H; TANUMA, N; MATSUURA, N; TAKEKAWA, M; URANO, T; KATAOKA, T; UBUKATA, M; KIKUCHI, K. 2003. Usage of tautomycin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1), reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 in vivo. *J Biol Chem* 278:82-88.

MIYATA, K; OMORI, N; UCHINO, H; YAMAGUCHI, T; ISSHIKI, A; SHIBASAKI, F. 2001. Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway neuroprotective effect of cyclosporine A in forebrain ischemia. *Neuroscience* 105:571-578.

MURAT, A.; PELLIEUX, C.; BRUNNER, H.R.; PEDRAZZINI, T. 2000. Calcineurin blockade prevents cardiac mitogen-activated protein kinase activation and hypertrophy in renovascular hypertension. *J Biol Chem* 275:40867-40873.

OLSON, E.N.; WILLIAMS, S.R. 2000. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* 101:689-692.

POWELL, J.A.; CARRASCO, M.A.; ADAMS, D.; DROUET, B.; RIOS, J.; MULLER, M.; ESTRADA, M.; JAIMOVICH, E. 2001. IP3 receptor function and localization in myotubes: an unexplored calcium-signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* 114:3673-3683.

SACCHETTO, R; DAMIANI, E; MARGRETH, A. 2001. Clues to calcineurin function in mammalian fast-twitch muscle. *J Muscle Res Cell Motility* 22: 545-559.

SHARMA, S; BAGNALL, M; SUTTON, M; CAREW, T. 2003. Inhibition of calcineurin facilitates the induction of memory for sensitization in Aplysia: requirement of mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* 100:4861-4866.

SHAYWITZ, A AND GREENBERG, M. 1999. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-861.

SIM, A AND LUDOWYKE, R. 2002. The complex nature of protein phosphatases. *IUBMB LIFE* 53:283-286.

SCHIAFFINO, S AND SERRANO, A. 2002. Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *TIPS* 1-7.

STEMMER, P.M AND KLEE, C.B. 1994. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33:6859-6866.

VOET, D and VOET, J. 1995. *Biochemistry*,. 2º Edición, Cap 34, pág 1249. Editorial John Wiley and sons inc.

WADZINSKI, B; WHEAT, W; JASPERS, S; PERUSKI, L; LICKTEIG, R; JOHNSON, G; KLEMM, D. 1993. Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 13:2822-2834.

WINDER, DG AND SWEATT, D. 2001. Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nature Rev Neurosci* 2:461-474.

WU, G.Y.; DEISSEROTH, K.; TSIEN, R.W. 2001. Activity-dependent CREB phosphorylation: Convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2808-2813.

ZAKANY, R; SZUCS, K; FELSZEGHY, S; CZIFRA, G; BIRO, T; MODIS, L; GERGELY, P. 2002. Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase a signaling pathway during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res* 275:1-8.

ZHOU, B.; WANG, Z.X.; ZHAO, Y.; BRAUTIGAN, D.L.; ZHANG, Z.Y. 2002. The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *J Biol Chem* 277:31818-31825.

ZOU, Y; YAO, A; ZHU, W; KUDOH, S; HIROI, Y; SHIMOYANA, M; UOZUMI, H; KOHMOTO, O; TAKAHASHI, T. 2001. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation* 104:102-108.