

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



**EXPRESIÓN ALTERADA DE GENES POR ATP EN FIBRAS
MUSCULARES ADULTAS DE RATONES C57 CON CÁNCER**

JORDANA BERNARDITA NEIRA FUENTES

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN FISIOLÓGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dr. Enrique Jaimovich Pérez

2014

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

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas presentada por la candidata

JORDANA BERNARDITA NEIRA FUENTES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas, mención Fisiología en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de Abril de 2014.

Prof. Dr. Enrique Jaimovich

Director de Tesis

**Programa de Biología Molecular y Celular, Instituto de Ciencias Biomédicas,
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. RICARDO ARMISEN

PROF. DR. MARIO CHIONG

PROF. DR. SERGIO VILLANUEVA B.

Presidente de la comisión de examen.

“La creación intelectual es el más misterioso y solitario de los oficios humanos”

Gabriel García Márquez

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos quienes he conocido y me han acompañado en estos tres años de camino y esfuerzo.

A los testigos cercanos de este andar, mis amigos del laboratorio por su complicidad y empatía, en las buenas y en las malas.

Al profesor Enrique que me dio un espacio y una gran responsabilidad en algo nuevo para mí, la ciencia.

A todos los que partieron en este período porque también estuvieron allí.

A los buenos amigos de la vida, que han esperado pacientemente mientras yo les decía no puedo tengo que ir al lab.

A los que me han acompañado desde siempre, mi familia.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
Interleuquina 6.....	11
Interleuquina 6 en Caquexia.....	12
ATP.....	14
Modelos de Cáncer.....	15
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Animales.....	19
Bioquímica sanguínea.....	20
Western Blot.....	21
Cultivo de fibras musculares.....	22
Medición de ATP extracelular.....	23
Estimulación con ATP extracelular.....	24
Extracción y cuantificación del RNA total.....	24

Síntesis de cDNA por transcripción inversa.....	24
PCR en tiempo real (q-PCR).....	25
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS	27
1. Descripción del modelo murino de cáncer.....	27
1.1. Atrofia.....	27
1.2. Peso.....	27
1.3. Tiempo de agarre.....	28
1.4. Anemia.....	29
1.5. Pruebas bioquímicas.....	30
2. Señalización por ATP en las fibras musculares.....	31
2.1. ATP extracelular.....	31
2.2. Cambio de medio e incubación con carbenoxolona.....	32
2.3. Expresión de receptores purinérgicos P2Y.....	33
3. ATP y expresión de genes.....	34
3.1. Expresión de IL-6.....	34
3.2. Atrogenes.....	35
3.3. Genes de apoptosis.....	36
3.4. Razón Bax/Bcl-2.....	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

RESUMEN

El deterioro sistémico por cáncer es un síndrome clínico que se manifiesta en etapas avanzadas como caquexia y compromete al paciente desde el punto de vista funcional caracterizándose por la baja de peso debido principalmente a una disminución de la masa muscular con o sin pérdida de tejido adiposo. Esto puede ser acompañado por anorexia, inflamación y anemia, que pueden contribuir a la disminución de la fuerza muscular y fatiga. Un posible mecanismo es el aumento en los niveles séricos de interleuquina 6 (IL-6), una citoquina que es capaz de sintetizar el músculo en condiciones de ejercicio pero que en condiciones de inflamación podría mediar el deterioro muscular asociado a la presencia del tumor en el organismo. Para estudiar este fenómeno se empleó un modelo de melanoma murino que permita objetivar el deterioro del músculo esquelético descrito en la literatura.

El músculo es capaz de producir IL-6 mediante el acoplamiento excitación-transcripción que se produce cuando la fibra muscular se despolariza, libera ATP al medio extracelular. El ATP liberado actúa en forma autocrina mediante receptores nucleotídicos que promueve el aumento citosólico y nuclear de calcio, y en consecuencia la expresión de genes, entre éstos el gen para IL-6. De esta forma se postula que el ATP estaría participando en la síntesis de IL-6 en condiciones de ejercicio. Además se sabe que en condiciones basales la fibra muscular libera ATP al medio extracelular. Por lo tanto cabe la pregunta de cuál sería el papel del ATP como una molécula intermediaria en la expresión de IL-6 y otros genes en el músculo esquelético afectado por cáncer.

El propósito de este estudio fue investigar las posibles alteraciones en la señalización por ATP en fibras musculares de ratón en presencia de cáncer. Los principales hallazgos de este estudio fueron los cambios observados en los niveles de ATP extracelular. Sugerimos que el mecanismo responsable sería la mayor liberación de ATP desde la fibra muscular, lo que posiblemente contribuye a una expresión de genes alterada, tanto de IL-6 como algunos genes relacionados con

apoptosis (BIM y PUMA) que podrían participar de la atrofia observada en el músculo esquelético en presencia de cáncer.

ABSTRACT

Systemic deterioration caused by cancer is a clinical syndrome that manifests as cachexia in advanced stages that is characterized by weight loss, mainly due to a decrease in muscle mass, with or without adipose tissue loss. This may be accompanied by anorexia, inflammation and anemia, which can also contribute to the decline of muscle strength and fatigue. One possible mechanism is a serum levels increase of interleukin 6 (IL-6), a cytokine synthesized by muscle during exercise conditions but during inflammation associated with the tumor presence in the organism, could mediate muscle wasting. To study this phenomenon, a murine melanoma model objectively allowing skeletal muscle wasting was used.

IL-6 is produced by the excitation- transcription process that occurs when the muscle fiber is depolarized and ATP is released into the extracellular medium. The released ATP by nucleotide receptors promotes nuclear and cytosolic calcium increase and increases gene expression including IL-6. Thus it is postulated that ATP would be participating in the synthesis of IL-6 in exercise conditions. At baseline, muscle fiber ATP is released into the extracellular medium. So the question arises of which is the role of ATP as an intermediary molecule in the expression of IL-6 and other genes in skeletal muscle affected by cancer.

The purpose of this study was to investigate possible alterations in ATP signaling in mouse muscle fibers in the presence of cancer. Our results showed an increase in extracellular ATP levels. We propose that the muscle fibers of tumor bearing animals has an increased release of ATP. This altered release of ATP will induce an abnormal gene expression of IL-6 and some apoptotic-related genes (BIM and PUMA). These proteins could be involved in the atrophy observed in skeletal muscle in the presence of cancer.

INTRODUCCIÓN

La caquexia es un síndrome metabólico complejo asociado con una enfermedad crónica subyacente, caracterizado por una pérdida de masa muscular con o sin pérdida de tejido adiposo. La característica clínica destacada es la pérdida de peso en adultos (corregido por la retención de fluidos) o el retardo del crecimiento en niños (excluyendo desórdenes endocrinos). Adicional a este criterio puede estar presente la fatiga, anorexia, bajo índice de masa libre de grasa y alteración de la bioquímica sanguínea (anemia, marcadores inflamatorios elevados, albúmina sérica disminuida). El deterioro muscular se caracteriza por una acelerada pérdida de masa muscular que se diferencia de los efectos producidos por el ayuno, la pérdida de masa muscular relacionada con la edad (sarcopenia), depresión primaria, mal absorción e hipertiroidismo y está asociado con elevada morbilidad. El deterioro muscular distingue a la caquexia de la pérdida de peso debido solamente a la menor ingesta calórica, y se relaciona con la elevada fatigabilidad de los pacientes. La anorexia, inflamación, insulinoresistencia y aumento de la degradación de proteínas también están relacionados con la enfermedad del deterioro muscular (“*wasting*”) (Evans et al. 2008; Evans 2010).

La pérdida progresiva de masa muscular caracteriza la progresión de la caquexia por cáncer. Un desbalance entre la síntesis y la degradación de proteínas reduce la masa de proteínas en el músculo esquelético, y la elevada degradación de proteínas puede ser la etapa limitante de la caquexia (Acharyya & Ladner 2004; Lecker et al. 2006; Clarke et al. 2007).

La pérdida de masa muscular resulta en debilidad, dando paso a inmovilidad y muerte debido a la pérdida de la función muscular respiratoria. Los pacientes con una pérdida de peso corporal mayor a 15% son más propensos al deterioro de la función fisiológica, y la muerte normalmente ocurre cuando la pérdida de peso es alrededor del 30% (Michael J. Tisdale 2002).

Dado que la presencia de caquexia está asociada a un pobre pronóstico en los pacientes por su carácter irreversible, se hace importante conocer los mecanismos que participan en el deterioro muscular que anteceden esta etapa.

Interleuquina 6

La interleuquina-6 es miembro de una familia de citoquinas multifuncionales que incluyen IL-11, factor inhibitorio de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), y cardiotrofina-1 (CT-1), entre otras. La IL-6 es comúnmente descrita como una citoquina pleiotrópica, la cual es producida por una variedad de tipos celulares, señala en variados tipos de células blanco, y tiene la capacidad de inducir diferentes vías de señalización intracelular. Los niveles circulantes de IL-6 son muy bajos o indetectables, y se incrementan dramáticamente frente a un estado inflamatorio, a menudo se relacionan con la fase aguda de la respuesta inmune a la infección. A través de interacciones del tipo receptor unido a ligando, IL-6 puede inducir la señalización intracelular en una amplia variedad de tipos celulares incluyendo células de músculo liso, hepatocitos, y células troncales hematopoyéticas. La diversidad de blancos regulatorios de la IL-6 se relaciona directamente con los dos tipos de receptores que posee, uno unido a membrana y otro soluble. El receptor de IL-6 de membrana en las células blanco forma un heterodímero con el receptor de la superficie celular gp130, y este complejo activa una vía de señalización intracelular. El receptor gp130 es conocido como el receptor que transduce la señal, y es expresado en la membrana plasmática de muchos tipos celulares (Scheller & Rose-John 2006; Wolsk et al. 2010; Carson & Baltgalvis 2011; Whitham et al. 2012).

Una vez formado el heterodímero con el receptor gp130, permite activar a dos proteínas tirosina quinasa no receptora (JAK) por transfosforilación. La activación de JAKs permite la fosforilación de una familia de proteínas transductoras y activadoras de la transcripción (STAT). Esta vía de señalización es referida comúnmente como JAK/STAT, y permite que las proteínas STAT activadas dimericen y transloquen al núcleo para activar la transcripción de genes relacionados a procesos tales como la inflamación, angiogénesis, supervivencia

celular y transformación celular relacionada al cáncer. La señalización de IL-6 por STAT también induce la retroalimentación negativa al incrementar la transcripción de las proteínas supresoras de citoquinas (SOCS) (Carson & Baltgalvis 2011; Scheller & Rose-John 2006).

Por otra parte, el músculo es capaz de producir IL-6 durante el ejercicio (Wolsk et al. 2010; Whitman et al. 2005). Un mecanismo que se postula es mediante el acoplamiento excitación-transcripción que se produce cuando la fibra muscular se despolariza, libera ATP al medio extracelular y mediante receptores nucleotídicos promueve el aumento citosólico y nuclear de calcio, y en consecuencia la expresión de genes, entre éstos el gen para IL-6 (figura 1) (Juretic et al. 2005; Casas et al. 2010). De esta forma el ATP estaría participando en la síntesis de IL-6 en condiciones de ejercicio, por lo tanto la estimulación exógena con ATP puede evocar aumento en el contenido de mRNA de IL-6 como ha sido descrito previamente. Además, IL-6 puede inducir su propia síntesis en el músculo mediante la retroalimentación positiva activando la vía canónica de IL-6 (Bustamante et al. 2014; Fernández-Verdejo et al. 2013).

Interleuquina 6 en Caquexia

Se ha descrito en la caquexia por cáncer un estado inflamatorio generalizado. Las citoquinas proinflamatorias que han sido implicadas en el deterioro muscular son IL-6, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleukina-1 β (IL-1 β), y el interferón- γ (IFN- γ). Aunque muchos mediadores inflamatorios pueden jugar un papel en el deterioro del músculo durante la caquexia, la IL-6 ha emergido como un factor crítico relacionado a la mantención de la masa muscular durante la enfermedad (Michael J. Tisdale 2002).

Una importante consideración respecto a los efectos de esta citoquina es el tiempo en que los niveles de IL-6 permanecen elevados. Por ejemplo el aumento agudo con el ejercicio puede durar horas y estaría asociado al metabolismo muscular (Kelly et al. 2004; Kelly et al. 2009). Pero en el caso del cáncer los niveles de IL-6

permanecen elevados por semanas o meses asociándose en este caso a atrofia (Haddad et al. 2005; White et al. 2012; Bonetto et al. 2012).

Modelo de Trabajo

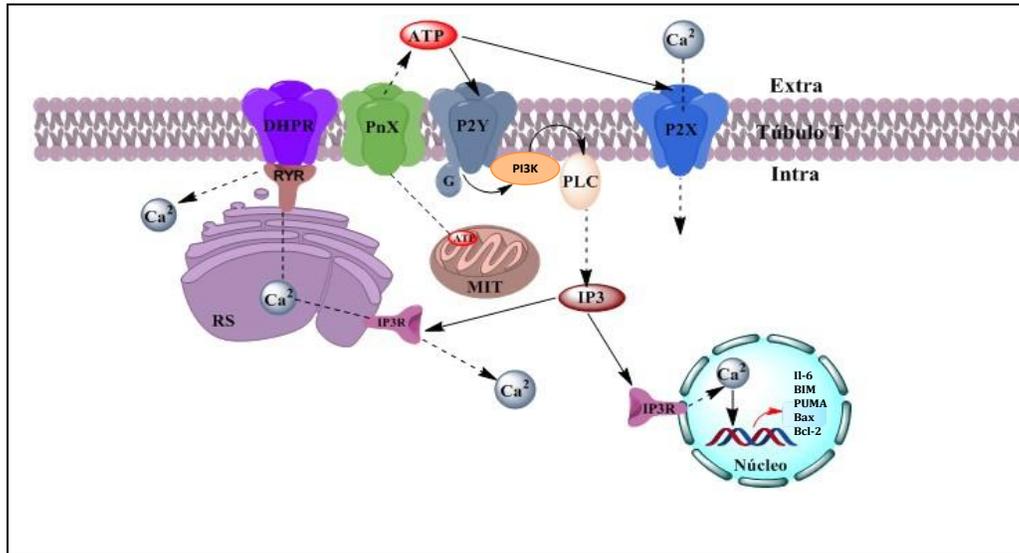


Figura 1. Acoplamiento excitación-transcripción en el músculo esquelético. El incremento citosólico y nuclear de calcio dependiente de IP3 tras la activación de esta vía de señalización, lleva al aumento en el mRNA de IL-6 y de genes apoptóticos. DHPR, receptor de dihidropiridins; PnX, hemicanal de panexina; P2Y, receptor nucleotídico metabotrópico; P2X, receptor nucleotídico ionotrópico; PI3K, fosfoinositol-3 kinasa; PLC, fosfolipasa C; IP3R, receptor de IP3; RyR, receptor de ryanodina; RS, retículo sarcoplasmático; MIT, mitocondria.

Otra consideración es la fuente de origen de IL-6 y el nivel de expresión del receptor para IL-6, lo cual puede impactar en el tipo de tejido que responde a IL-6 y particularmente en la homeostasis del músculo. Mientras el músculo es un importante productor de IL-6 circulante durante el ejercicio, otras fuentes de IL-6 son las células inmunes en respuesta a una infección, o un tumor en el caso del cáncer, que puede ser una probable fuente de producción de IL-6 en la enfermedad. Por último, la elevación crónica de IL-6 circulante se asocia a menudo con una enfermedad subyacente, y los aspectos específicos de los diferentes estados de la enfermedad pueden servir para alterar el nivel de la

respuesta sistémica y del tejido a elevados niveles de IL-6 (Carson & Baltgalvis 2011).

A partir de esto surge la interrogante respecto a cómo responde el músculo frente a la producción de IL-6 durante el tiempo en que se desarrolla el tumor y la inflamación concomitante a la presencia del tumor en el organismo.

ATP

El ATP (adenosina 5'-trifosfato) es una molécula considerada como fuente de energía en la célula, que actúa como dadora de grupos fosfato en reacciones de fosforilación y como regulador alostérico de proteínas. El ATP es considerado además como una molécula de señalización celular tanto autocrina como paracrina que utiliza receptores purinérgicos ubicados en la membrana de prácticamente todas las células eucarióticas. La liberación basal de ATP puede ocurrir frente a perturbaciones físicas y químicas, y mediante múltiples mecanismos de liberación, como canales de panexina y conexinas, canales aniónicos regulados por volumen, mediante exocitosis de vesículas que contienen ATP y por último la salida pasiva de ATP desde la célula cuando se produce la desestabilización de la membrana en estados de necrosis (Fitz 2007; Krysko et al. 2012; Krysko et al. 2013).

Se ha propuesto que las células bajo condiciones de estrés o daño exponen o liberan moléculas en su superficie que funcionan como señales de daño para el sistema inmune innato. Estas señales son llamadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Krysko et al. 2012; Krysko et al. 2013). La capacidad de generar una respuesta inmune a partir de las células que mueren a través de distintas vías es usualmente mediada por DAMPs, entre estas se encuentran aquellas que pueden ser liberadas, como el ATP o HMGB1 (*high mobility group protein B1*), y otras expuestas en la superficie de la célula como calreticulina (CRT)(Krysko et al. 2012; Krysko et al. 2013; Garg et al. 2010). Muchas de estas moléculas no poseen un papel inmunogénico hasta que son expuestas en la superficie de la célula o son secretadas y participan en lo que se ha denominado

la muerte celular inmunogénica. El ATP extracelular es considerado como una molécula del tipo “*find me*”(Ravichandran 2011), es decir que atrae a las células del sistema inmune y es liberada desde células apoptóticas, que es detectada por receptores P2Y y monocitos (Krysko et al. 2012; Krysko et al. 2013; Garg et al. 2012; Garg et al. 2010). Se ha propuesto que elevados niveles de ATP circulantes en la sangre estarían asociados a un efecto protector por supresión de formación de tumores en el organismo, que ha sido estudiado tanto en animales como en humanos (Agteresch et al. 2000; Abraham 2003; White et al. 2009). Sin embargo se desconoce la participación del músculo esquelético en la señalización por ATP en condiciones de cáncer y el efecto que tendría en la actividad de genes apoptóticos como Bax, BIM, PUMA y Bcl-2.

Modelos de Cáncer

Para estudiar el deterioro por cáncer que ocurre en humanos se han utilizado modelos animales empleando preferentemente líneas de células tumorales implantadas. Estas células tumorales son implantadas subcutáneamente en animales experimentales y se les permite que crezcan hasta un punto en el cual se generan síntomas de caquexia. Las líneas celulares implantadas no producen metástasis significativamente (una diferencia clave de las caquexias causadas por neoplasias en humanos). En relación a la etiología de la caquexia, las células tumorales comúnmente usadas inducen caquexia mediante factores que libera el tumor y estimulan las interacciones con el huésped, de esta forma se imita lo que sucede en humanos (Bennani-Baiti & Walsh 2011).

El modelo de melanoma murino desarrollado en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Dr. Andrew Quest (Figura 2) (Nicolson et al. 1978; Lobos-González et al. 2011), proporcionado para este estudio de la caquexia, se obtiene a partir de células tumorales de melanoma de ratón que se desarrollan espontáneamente, estas células denominadas B16F0 (probablemente metastásicas) son seleccionadas por su capacidad de colonizar el pulmón después de la inyección intravenosa ya que son fácilmente detectables por su pigmentación. Para esto, ratones C57BL6 se inyectan con células tumorales en la vena de la cola, luego de su expansión en

el pulmón las células se extraen y cultivan para ser nuevamente inyectadas en otro animal, repitiendo el ciclo unas 10 veces, hasta lograr un grupo celular llamado B16F10 (altamente metastático). Dependiendo de su microambiente estas células se comportan de distinta forma, si son inyectadas subcutáneamente desarrollan un tumor palpable bien definido, pero si son inyectadas por vía intravenosa colonizan el pulmón desarrollando nódulos melanocíticos definidos (Nicolson, Brunson, and Fidler 1978; Bennani-Baiti and Walsh 2011).

Modelo de Melanoma Murino

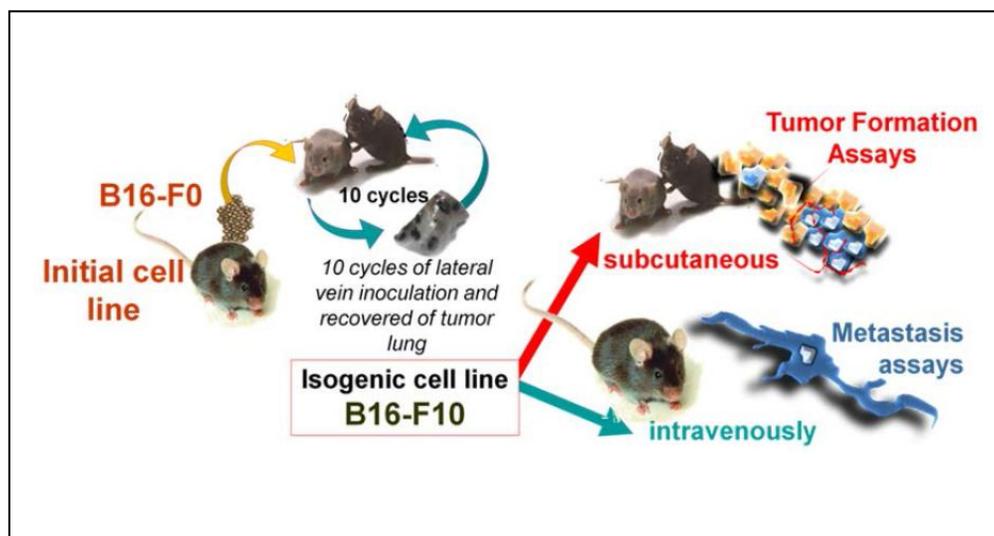


Figura 2. El esquema muestra el origen de las células B16F0 (pobremente metastásicas) y cómo las células B16F10 (altamente metastásicas) son obtenidas de ciclos repetitivos de inyección en la cola de un ratón y recuperación desde el pulmón. Además la figura destaca que las células pueden utilizarse en ensayos de formación de tumores o de metástasis.

El primer modelo a utilizar en este estudio es el de implantación de las células tumorales en el flanco del animal. Las ventajas que ofrece este modelo singénico son el crecimiento rápido, sincronizado y reproducible del tumor, el fácil acceso para la medición del tamaño del tumor y la composición corporal, y la presencia del sistema inmune intacto en el animal. El segundo modelo de estudio se obtuvo mediante la inyección intravenosa de células que colonizan el pulmón y otros

órganos como riñones, hígado, bazo y forman nódulos melanocíticos bien definidos (Bennani-Baiti & Walsh 2011; Sandilos et al. 2012).

HIPÓTESIS

En un modelo de cáncer por melanoma se encuentra alterada la expresión normal de genes asociada a la señalización por ATP en las fibras musculares.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las alteraciones de la activación de genes dependientes de ATP en cultivos de fibras del músculo *Flexor Digitorum Brevis* (FDB) en ratones expuestos a la actividad tumoral por melanoma.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Describir el modelo de cáncer generado por un tumor de melanoma cutáneo en ratones.*
- 2. Determinar si la liberación basal de ATP en fibras musculares de ratones con cáncer por melanoma se encuentra alterada.*
- 3. Determinar el cambio en la expresión de genes asociados a la señalización por ATP como IL-6 y genes de apoptosis.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

El estudio de animales con cáncer por melanoma se desarrolló en base a un modelo ya establecido, basándose en el protocolo de trabajo del Laboratorio de Comunicaciones Celulares, con evaluaciones antes de la inoculación y una vez terminado el ensayo. En una primera etapa se realizó la caracterización del modelo de cáncer, luego experimentos con cultivos de fibras adultas para medir ATP extracelular y la expresión de genes posterior al estímulo con ATP.

Se emplearon ratones C57-BL/6 macho de 6 a 8 semanas al inicio de los experimentos. Los ratones se mantuvieron con un ciclo de 12: 12 h oscuridad: luz y alimentados *ad libitum* con agua y dieta estándar para ratón (Prolab® RMH 3000). Los animales se dividieron en dos grupos, un grupo sometido al ensayo tumoral con células B16F10 mediante inyección subcutánea y un segundo grupo de ratones inoculados por vía venosa. Los animales control se obtuvieron desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El ensayo tumoral estuvo a cargo del Laboratorio de Comunicaciones Celulares. El protocolo consistió en anestesiarse los animales por vía intramuscular con la mezcla Ketamina (22-44 mg/Kg, im), Xilazina (2-5 mg/kg, im), Acepromazina (0,75 mg/kg, im). Posteriormente los animales se inocularon en el lomo con 300.000 células B16-F10 en 100 µL de solución fisiológica mediante jeringas de insulina Plastipak 1 mL. Después de 15 días los animales se sacrificaron obteniéndose los tumores y los músculos a analizar. En el ensayo de metástasis se inyectaron al animal 200.000 células B16F10 en 500 µL de solución salina, en la vena de la cola. Después de 21 días los animales se sacrificaron, los órganos se removieron y necropsiaron para obtener los nódulos melanocíticos y los músculos a analizar. Este protocolo cuenta con la aprobación por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Antes de realizar la inoculación de las células, a los animales se les midió el peso y la fuerza muscular mediante el Hanging Wire Test. Este test consiste en medir el tiempo de agarre del ratón al quedar suspendido en una varilla horizontal ubicada

a 35 cm sobre una superficie blanda. Los animales fueron suspendidos de la cola y se les permitió agarrarse utilizando las dos patas delanteras. Una vez que el ratón se suspendió por sí mismo se registró el tiempo de suspensión considerando 3 intentos con un tiempo de 30 segundos entre cada intento, y un límite superior para el tiempo de suspensión de 180 segundos (Putten 2014).

Siete días después de la inyección, los tumores formados fueron medidos con un pie de metro el alto y ancho en milímetros de los tumores formados. El volumen del tumor formado se calculó con la siguiente fórmula: $V = (\text{ancho mm})^2 \times \text{largo mm} \times 0,5236$. Quince días después de la inoculación de las células, a los animales se les midió el tiempo de agarre, fueron pesados y sacrificados por inyección de una sobredosis de Ketamina/Xilazina (10%/2%) (100 mg/kg peso/10 mg/kg peso) y dislocación cervical.

Esta etapa se modificó en un grupo animales de los que se obtuvieron muestras de sangre manteniendo la sobredosis de anestésicos. Luego, los ratones se limpiaron con algodón estéril y alcohol desnaturalizado al 70%, y se dispusieron en una superficie plastificada exponiendo el abdomen. Posteriormente se procedió a obtener una muestra de sangre por punción cardiaca transtorácica empleando una jeringa de tuberculina Plastipak 1 mL recubierta con EDTA. La sangre se almacenó en tubos Eppendorf 1,5 mL y refrigeró hasta su utilización. Luego se procedió a cortar las patas traseras con tijera y a retirar la piel, con pinzas quirúrgicas. Posteriormente se disecaron los músculos tibial anterior y flexor digitorum brevis (FDB) desde los tendones del paquete muscular. Los músculos tibial anterior se congelaron con nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -80°C y utilización en pruebas de Western Blot.

Bioquímica Sanguínea

De la muestra obtenida por punción cardiaca transtorácica se tomó una parte de éstas para ser procesada en un citómetro de flujo, obteniéndose el hemograma completo. El otro grupo de muestras se utilizó para medir albúmina y GPT empleando solamente el plasma.

El análisis de parámetros bioquímicos y marcadores inflamatorios en el plasma se efectuó con Kits comerciales para Albúmina y GPT (Wiener lab.), según las instrucciones del fabricante.

Western Blot

Se lisó el músculo Tibial Anterior en un amortiguador de lisis consistente en: Tris-HCl pH 7,5 (20 mM), Triton X-100 (1%), EDTA pH 8 (1 mM), EGTA pH 8 (1 mM), NaF (20 mM), Na₂P₂O₇ (1 mM), Glicerol (10%), NaCl (140 mM), Na₃VO₄ (10 mM), PMSF (1 mM) y mezcla de inhibidores de proteasas (Merck). Se trituraron las muestras con una minipier, el sobrenadante se traspasó a un tubo Eppendorf 1,6 mL y para ser sonicadas durante 1 minuto. Luego las muestras se mantuvieron durante 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron y una fracción se utilizó para determinar la concentración de proteínas de la muestra (reactivo Coomassie Plus TM Protein Assay (Thermo Scientific)) utilizando BSA (albúmina de suero bovina) como estándar. Luego, las proteínas fueron suspendidas en una solución amortiguadora denaturante consistente en: Tris-HCl pH 6,8 (62,6 mM), SDS (sodio dodecil sulfato) (2%), azul de bromofenol (0,01%), glicerol (10%) y DTT (100 mM). Posteriormente las muestras se calentaron a 80°C durante 5 minutos. Se realizó la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida (10%) cargando para ello 7 µg de proteínas. Una vez terminada la separación de proteínas por electroforesis se realizó la transferencia de éstas a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) previamente activadas en metanol. Para evitar el marcaje inespecífico, las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en TBS-Tween 0,05% (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 137 mM NaCl (TBS) más Tween 20 0,05%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C o bien a temperatura ambiente durante 2 horas, dependiendo del anticuerpo utilizado. Las membranas se lavaron tres veces con una solución TBS-Tween 0,05% y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa, a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez completada esta

etapa las membranas se lavaron tres veces por 10 minutos con una solución TBS-Tween 0,05% a temperatura ambiente en agitación constante. La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con un kit (Rapid Step™ ECL Reagent, Calbiochem). Posteriormente las membranas se recuperaron y trataron con una solución que permitió retirar los anticuerpos previamente utilizados (glicina 0,2 M pH 2, Tween 20 0,05% por 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente) e incubarlos con un anticuerpo control, para la normalización de la carga de proteínas en el gel. Las imágenes de las películas se digitalizaron y analizaron por densitometría con el programa ImageJ 1.39U (NIH, Bethesda, MA).

El anticuerpo primario utilizado para Western blot fue α -actina sarcomérica (Sigma Chemical Company, EEUU, monoclonal, ratón, dilución 1:15000 en TBS- T 0,05% con un tiempo de incubación de 2 horas). El anticuerpo secundario usado fue anti-inmunoglobulina de ratón conjugada con peroxidasa (Pierce Biotechnology, dilución 1:5000 en TBS- T 0,05%). Dado que las proteínas frecuentemente utilizadas como control de carga tenían una alta variabilidad en los músculos de ratones con cáncer, la normalización fue hecha con el carril completo de proteínas del gel teñido con Azul de Coomassie.

Cultivo de fibras musculares aisladas

Se utilizaron ratones normales (C57BL/6) y animales inoculados con células tumorales (C57BL/6) para la extracción de fibras adultas. Los animales se trabajaron de acuerdo al protocolo de bioética aprobado por el “Comité de Bioética sobre Investigación en Animales” de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las fibras musculares aisladas se obtuvieron enzimáticamente a partir del músculo FDB. Este músculo fue disecado de ambos tipos de animales, para luego ser digerido con colagenasa II (1 mg/mL) por una hora y cuarenta min en medio DMEM (Gibco) con agitación (170 rpm) y a una temperatura de 37°C. Luego, el músculo se disgregó mecánicamente al pasarlo de forma sucesiva por pipetas con diferentes diámetros, empezando de la más ancha a la más delgada. Este proceso se realizó en medio DMEM suplementado con 10% de suero de caballo. El

proceso finalizó cuando ya no se observaron acúmulos de fibras musculares y se pudo distinguir fibras disgregadas macroscópicamente. Luego, las células se transfirieron a placas de 35 mm tratadas previamente con 15 μ l con Matrigel y se mantuvieron por 10 minutos para permitir una mayor adhesión y estabilización antes de adicionar 2 mL de medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM – 10% suero de caballo, 1% penicilina/ streptomycin). Las fibras se mantuvieron en estufa a 37°C y utilizaron al día siguiente de la preparación.

Medición de ATP extracelular

En los experimentos de medición de ATP extracelular, un grupo de muestras se sometió a estimulación mecánica por cambio de medio e incubación con 5 μ M de Carbenoxolona (CBX) (Sigma) 30 minutos previo al cambio de medio. Los tiempos de medición establecidos fueron a los 0, 30, 60, 90, 180, 300, 600, 900, 1200 y 1500 segundos a partir del cambio de medio. En otra partida de experimentos se realizó el cambio de medio y posterior a 30 minutos se obtuvieron las muestras para la medición, cada un minuto durante 15 minutos. El cambio de medio consistió en sustituir DMEM de las placas por 2 mL de solución Krebs (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM y glucosa 5 mM, pH=7,4).

Se extrajeron 75 μ l del medio extracelular en los tiempos señalados y se añadieron a 30 μ l de CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Luego de incubar por 10 minutos en oscuridad, las muestras fueron cuantificadas en un luminómetro (FB12, Berthold). En paralelo, se realizó una curva estándar a partir de 1 fmol a 100 pmol de ATP utilizando el mismo protocolo del kit. Los valores obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva estándar para determinar las concentraciones de ATP en cada condición. Se normalizaron los valores obtenidos de ATP en el extracelular utilizando la concentración de RNA total en cada placa. Para la determinación del total liberado se cuantificó el área bajo la curva para todos los trazos obtenidos en los diferentes tiempos estudiados y se normalizaron los valores obtenidos de los animales con cáncer como veces de cambio respecto al control.

Estimulación con ATP extracelular

Las fibras aisladas se sometieron a cambio de medio por solución Krebs y posterior a 30 minutos fueron estimuladas con ATP exógeno. El estímulo con ATP (Sigma) exógeno se realizó mediante adición de diferentes concentraciones de este nucleótido al medio extracelular de las fibras aisladas. Luego de 1 hora de incubación con ATP las fibras fueron analizadas.

Extracción y cuantificación del RNA total

El RNA total se extrajo tratando las fibras musculares estimuladas con el reactivo Trizol®, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cultivos de células tratados con 1 mL de Trizol se homogeneizaron con pipeta. Luego la preparación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, los lisados se trataron con 0,2 mL de cloroformo, y sometieron a agitación vigorosa durante 15 segundos. Las muestras se dejaron reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El RNA contenido en el sobrenadante se precipitó con 0,5 mL de isopropanol. Esta preparación se dejó durante 1 hora a -20°C y luego se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se lavó con etanol al 80% luego de lo cual el precipitado se resuspendió en 10 µL de H₂O sin nucleasas y se trató mediante el Kit Ambion® TURBO DNA-free™ (Applied Biosystems) para remover el DNA y subsecuentemente la DNasa y los cationes divalentes de la muestra, según instrucciones del fabricante. La concentración de RNA total se determinó con un espectrofotómetro mediante la medición de su absorbancia a 260 nm.

Síntesis de cDNA por transcripción inversa

Para la reacción de transcripción inversa se utilizó la enzima SuperScrip II (Invitrogen). Se incubó una mezcla de 1 µg de ARN total y 1 µL hexameros 0.5 µg/µL en un volumen final de 10 µL, durante 5 minutos a 70°C. Posteriormente, los tubos se colocaron en hielo durante 1 minuto y se adicionó una segunda mezcla con 4 µL de First Strand Buffer 5x, 2 µL de DTT 0.1 M, 1 µL dNTPs 10 mM, y 50 U de transcriptasa inversa SuperScript II en un volumen final de 10 µL. La síntesis

del cDNA se realizó incubando a 42°C durante 60 minutos y luego a 70°C por 15 minutos.

PCR en tiempo real (qPCR)

El PCR en tiempo real se realizó usando el equipo Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA). Utilizamos el kit para qPCR Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene). El Master Mix contiene las concentraciones adecuadas de amortiguador PCR, Taq DNA polimerasa, MgCl₂, dNTPs y SYBR Green. Utilizamos 1 µL de cDNA y 1 µL de partidor sentido 10 pmol/µL, 1 µL de partidor antisentido 10 pmol/µL. El volumen final de la mezcla se ajustó a 20 µL con la adición de H₂O sin nucleasas. Se realizaron reacciones sin cDNA templado para corroborar la amplificación específica de la reacción de PCR. Se utilizó el siguiente protocolo para la amplificación de todos los genes estudiados: 75°C por 3 minutos, y luego 50 ciclos de 60°C durante 20 segundos, y 90°C por 20 segundos. Los valores fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo 18S y fueron reportados por el método de $2^{-\Delta\Delta C}$ (Livak & Schmittgen 2001). Los productos de PCR se verificaron por análisis de las curvas de disociación.

Los partidores utilizados para investigar los genes asociados a atrofia se diseñaron a partir de las secuencias publicadas en NCBI GenBank con el programa PerlPrimer que se muestran en la tabla 1 (Marshall 2004). Los resultados se expresaron como unidades normalizadas en relación al control.

mRNA	Partidor Sentido (5'-3')	Partidor Antisentido (3'-5')
IL-6	GTATGAACAACGATGATGCAC	AGCTATGGTACTCCAGAAGAC
MURF1	CTGGCTTGATTCCGGACGGAAA	GGCAGCGGAAACGACCTCCA
Atrogina/MAFbx	CAGACCTGCATGTGCTCAGT	CCAGGAGAGAATGTGGCAGT
BIM	CGACAGTCTCAGGAGGAACC	CATTTGCAAACACCCTCCTT
PUMA	GCCCAGCAGCACTTAGAGTC	GGTGTGCGATGCTGCTCTTCT
Bax	GCTGACATGTTTGCTGATGG	GATCAGCTCGGGCACTTTAG
Bcl-2	AGTACCTGAACCGGCATCTG	GCTGAGCAGGGTCTTCAGAG
18S rRNA	GGGCCCGAAGCGTTTACTTT	TTGCGCCGGTCCAAGAATTT
P2Y1	TGGCGTGGTGTACCCTCTCAAGTC	CGGGACAGTCTCCTTCTGAATGTA
P2Y2	CTGGAACCCTGGAATAGCAC	GCTGGTGGTGCAGGAAGTAGA
P2Y4	AGCCCAAGTTCTGGAGATGGTG	GGTGGTTCCATTGGCATTGG
P2Y6	CACCTGTGATTTGGCAACTG	TCTTGGCAAATGGATGTGAA
P2Y11	ACTGGTGGTTGAGTTCCTGG	TCAGGTGGGAGAAGCTGAGT
P2Y12	CACCTCAGCCAATACCACCT	AACATGAAGGCCAGATGAC
P2Y13	GAAGAGAGGCACATGCAACA	TTACTAATGCCAGGCCAACC
P2Y14	CAGTGCATGGAGCTCAAAAA	GCAGCCGAGAGTAGCAGAGT

Tabla 1: Secuencia de los partidores utilizados para la detección de los niveles de mRNA en fibras adultas de ratón.

Análisis estadístico

Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 5. Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar del promedio. Al comparar entre parejas de datos se usó la Prueba T para muestras pareadas y el test U de Mann-Whitney para muestras no pareadas. En aquellos casos en los que se necesitó comparar entre los tres grupos del estudio el análisis se realizó mediante el test ANOVA de una vía comparando las condiciones de cáncer contra el grupo control, y para conocer la influencia de dos variables independientes sobre una dependiente, el test ANOVA de dos vías con el post hoc de Bonferroni. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Descripción del modelo murino de cáncer. Los resultados que se muestran a continuación están orientados a describir los efectos sistémicos del cáncer en los ratones con tumor subcutáneo y metástasis.

1.1 Atrofia. La pérdida de masa muscular es una consecuencia de la atrofia en procesos de enfermedad como el cáncer y ha sido asociada a una mayor degradación proteica. Se analizó el contenido total del músculo tibial anterior encontrándose una disminución en el contenido de la proteína sarcomérica alfa actina en el grupo con tumor subcutáneo, en comparación a los controles al término del ensayo (Figura 3, Prueba de Mann Whitney, $p=0,051$).

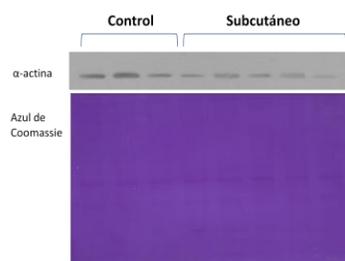
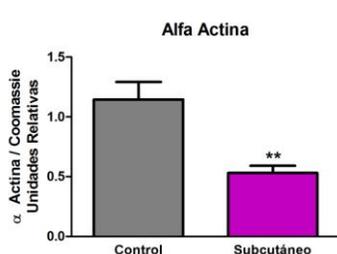


Figura 3. Atrofia del músculo tibial anterior mediante WB
Control (n=5), 1,15 ± 0,12. Tumor Subcutáneo (n=9), 0,53 ± 0,06. α-Actina/Coomassie, valores expresados en unidades relativas. Prueba de Mann Whitney, ** $p<0,01$.

1.2 Peso. Los animales se pesaron al comienzo y al término del ensayo tumoral. Los animales con tumor subcutáneo se pesaron al momento de la inoculación y posterior a 15 días, al término del ensayo tumoral. El grupo control después de 15 días no varió en el peso. Sin embargo los animales con tumor subcutáneo presentaron una ganancia asociada a la presencia del tumor (Figura 4A, Prueba T, $p=0,0012$). Este aparente aumento de peso fue analizado en un grupo de animales con tumor subcutáneo, se comparó el peso total del animal y al restar el peso del tumor al final del ensayo. Se observó que la ganancia de peso en los animales fue a expensas del tumor (Figura 4B, Prueba T, $p=0,0343$).

A.

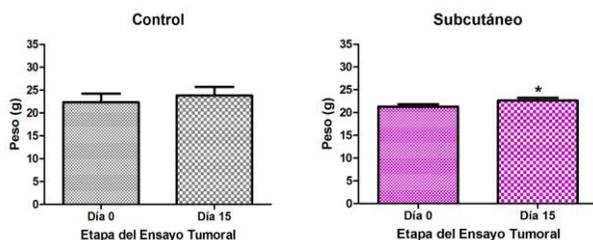
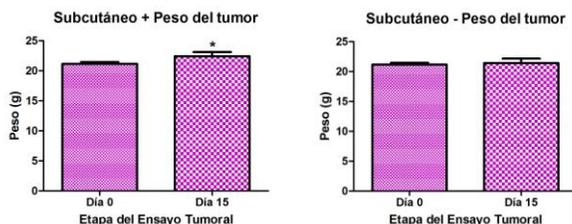


Figura 4. Peso de los animales

A. Aumento de peso en animales con tumor subcutáneo al término del ensayo.

Control: *Día Cero* (n=7), peso promedio=22,31 g ± 1,92. *Día 15* (n=7), peso promedio =23,82 g ± 1,85 (p=0,62). Tumor Subcutáneo: *Día Cero* (n=40), peso promedio=21,31 g ± 0,5. *Día 15*: (n=40), peso promedio= 22,61 g ± 0,62. Prueba T, *p<0,05.

B.



B. Comparación del peso de los animales con y sin el tumor subcutáneo al término del ensayo

Subcutáneo + Peso del tumor. *Día cero*: (n=6), peso promedio=21,16 g ± 0,3. *Día 15*, peso promedio=22,42 g ± 0,7. Prueba T, *p<0,05.

Subcutáneo - Peso del tumor. *Día cero*: (n=6), peso promedio=21,16 g ± 0,3. *Día 15*, peso promedio=21,4 g ± 0,8 (p=0,63).

La respuesta esperada a los 21 días era una ganancia de peso, que fue de 7 g aproximadamente, según lo observado en el grupo control (Figura 5; Prueba T, p=0,0041). Sin embargo, los ratones del ensayo de metástasis no aumentaron de peso al término del ensayo, posterior a 21 días.

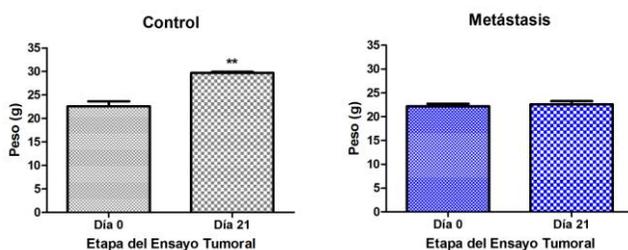


Figura 5. Mantenimiento del peso corporal en los animales con metástasis al término del ensayo.

Control: *Día Cero* (n=5), peso promedio=22,6 g ± 1,03. *Día 21*: (n=5), peso promedio =29,67 g ± 0,23. Prueba T, **p<0,01.

Metástasis: *Día 0* (n=18), peso promedio=22,2 g ± 0,51. *Día 21* (n=18), peso promedio= 22,59 g ± 0,67 (p=0,54).

1.3 Tiempo de Agarre. La evaluación mediante el *Hanging Wire Test* permitió realizar una evaluación funcional de los ratones midiendo el tiempo que el animal permanece suspendido de una varilla metálica mediante sus dos patas delanteras. El tiempo de agarre considera un indicador de la fuerza de éste, y se empleó dicha evaluación para comparar los grupos al comienzo y término del ensayo tumoral.

Al inicio del ensayo los grupos fueron similares entre sí, y al término del período de crecimiento tumoral se observó una disminución del tiempo en los ratones con tumor subcutáneo (Figura 6B; Prueba T, $p=0,0017$), a diferencia de los ratones con metástasis que no variaron en su rendimiento (Figura 6D; $p=0,9$). Los animales control no modificaron sus tiempos en forma significativa tanto a los 15 días ($p=0,56$) de ensayo como a los 21 días ($p=0,85$), lo que nos indicó que el rendimiento con esos intervalos de tiempo no generó una mejoría por repetición de la prueba.

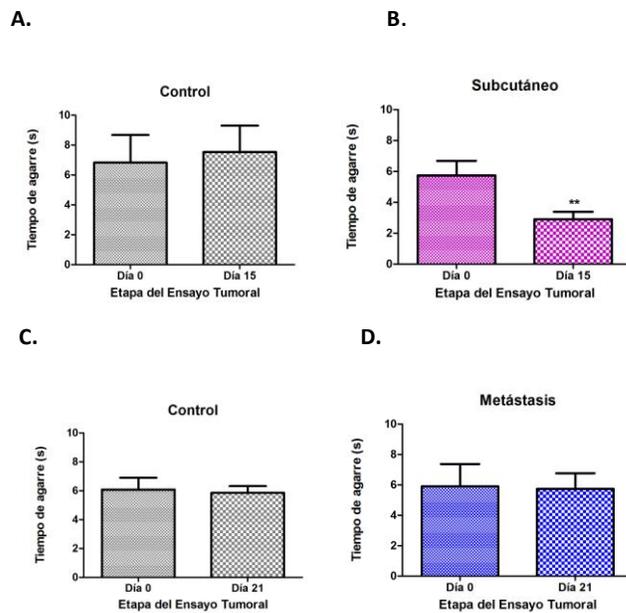


Figura 6. Tiempo de agarre de los animales mediante la prueba *Hanging Wire Test*

A. Control del ensayo de tumor subcutáneo. *Día Cero:* ($n=16$), tiempo promedio= $6,83 \text{ s} \pm 1,86$. *Día 15:* ($n=16$), tiempo promedio= $7,53 \text{ s} \pm 1,85$ ($p=0,56$).

B. Tumor subcutáneo. *Día Cero:* ($n=16$), tiempo promedio= $5,74 \text{ s} \pm 0,94$. *Día 15:* ($n=40$), tiempo promedio= $2,89 \text{ s} \pm 0,49$. Prueba T, $**p < 0,01$.

C. Control del ensayo de metástasis. *Día Cero:* ($n=4$), tiempo promedio= $6,07 \text{ s} \pm 0,82$. *Día 21:* ($n=4$), tiempo promedio= $5,85 \text{ s} \pm 0,47$ ($p=0,85$).

D. Metástasis. *Día Cero:* ($n=17$), tiempo promedio= $5,89 \text{ s} \pm 1,47$. *Día 21:* ($n=17$), tiempo promedio= $5,74 \text{ s} \pm 1,02$ ($p=0,9$).

1.4 Anemia. Se realizaron pruebas sanguíneas para evaluar el compromiso sistémico de los animales frente a la presencia del tumor. Las pruebas sanguíneas sólo pudieron realizarse en los animales con tumor subcutáneo. Los resultados indicaron que el hematocrito en los ratones al término del ensayo disminuyó en forma significativa en el grupo de animales con tumor subcutáneo en comparación al grupo control (Figura 7A; Prueba Mann Whitney, $p=0,0006$). El contenido de hemoglobina fue otro parámetro que se midió, obteniéndose también una disminución significativa en el grupo con tumor subcutáneo versus el grupo control (Figura 7B; Prueba Mann Whitney, $p=0,0021$).

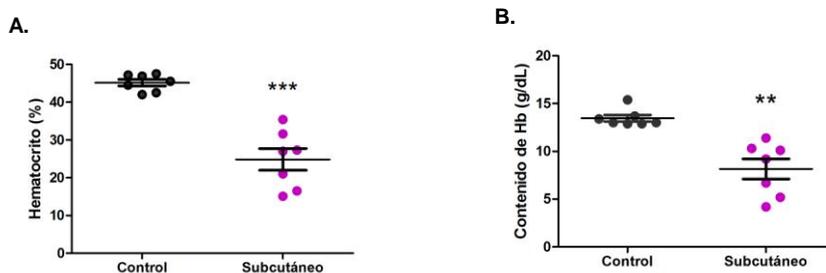


Figura 7. Presencia de anemia en los animales con tumor subcutáneo al término del ensayo.

- A. Hematocrito.** Control (n=7) $44,0\% \pm 0,85$; Tumor Subcutáneo (n=7) $24,84\% \pm 2,87$. Prueba T, *** $p < 0,001$.
B. Contenido de hemoglobina. Control (n=7) $13,47 \text{ g/dL} \pm 0,3$; Tumor Subcutáneo (n=7) $8,2 \text{ g/dL} \pm 1$. Prueba T, ** $p < 0,01$.

1.5 Pruebas Bioquímicas. Además de las pruebas sanguíneas se realizó la medición de dos marcadores bioquímicos para evidenciar el deterioro sistémico por la presencia del cáncer en los ratones del ensayo de tumor subcutáneo. Se midió el contenido de albúmina en sangre obteniéndose una disminución que fue estadísticamente significativa en el grupo con tumor subcutáneo respecto al grupo control (Figura 8A, Prueba Mann Whitney, $p=0,0064$). También se utilizó un marcador de daño hepático GPT (transaminasa glutámico-pirúvica), que se eleva en cualquier condición de daño que comprometa al hígado encontrándose también elevada en el grupo con tumor subcutáneo (Figura 8B, Prueba Mann Whitney, $p=0,016$).

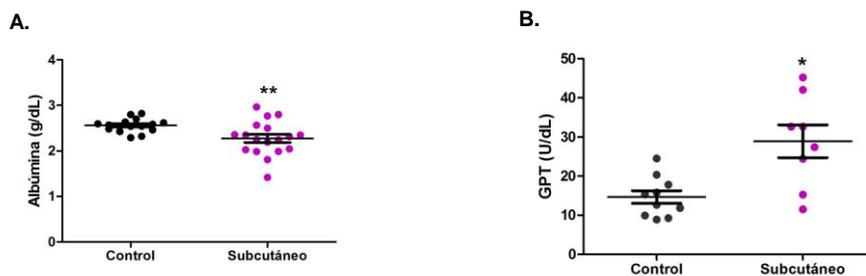


Figura 8. Bioquímica sanguínea alterada en los ratones con tumor subcutáneo al término del ensayo

- A. Albúmina.** Control (n=16) $2,56 \text{ g/dL} \pm 0,04$; Tumor Subcutáneo (n=18) $2,27 \text{ g/dL} \pm 0,09$. Prueba Mann Whitney, ** $p < 0,01$.
B. GPT. Control (n=10) $14,65 \text{ U/dL} \pm 1,7$; Tumor Subcutáneo (n=8) $28,91 \text{ U/dL} \pm 4,2$. Prueba Mann Whitney, * $p < 0,05$.

2. Señalización por ATP en la célula muscular

2.1 ATP extracelular. En cultivos celulares de fibras musculares aisladas de *FDB* mantenidas en DMEM, se midió el contenido extracelular de ATP. Para establecer una condición basal de medición se cambió el medio de cultivo a solución Krebs, y posterior a 30 minutos se recolectaron alícuotas del medio extracelular cada 1 minuto durante 15 minutos en total. El ATP se midió en las muestras mediante el método Luciferina/Luciferasa y se cuantificó usando una curva estándar de calibración. Al analizar la curva temporal de liberación de ATP, se observó que basalmente las fibras de ratones control liberan ATP al medio extracelular. En el caso de las fibras musculares de ratones con metástasis, se observaron peaks de liberación de ATP que fueron mayores en relación al grupo control al comparar punto a punto en el tiempo, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). El grupo con tumor subcutáneo mostró una liberación basal de ATP que presentó peaks mayores en relación al grupo control, y en relación al grupo con metástasis (Figura 9A).

Al analizar el contenido promedio de ATP extracelular por cada grupo en el tiempo señalado, se pudo apreciar que fue mayor en el medio de cultivo perteneciente a los grupos de tumor subcutáneo y metástasis en relación al grupo control (Figura 9B; ANOVA de una vía, $***p < 0,001$). Al comparar entre los dos grupos de animales con cáncer el grupo con tumor subcutáneo presentó más ATP en el medio extracelular en relación a los animales con metástasis (Figura 9B; ANOVA de una vía, $***p < 0,001$).

En la figura 9C se muestra el ATP extracelular de los grupos con cáncer normalizado por la actividad del control punto a punto en el tiempo durante 15 minutos, expresándose este resultado como veces de cambio. Los animales con tumor subcutáneo presentaron peaks de ATP extracelular que mostraron grandes variaciones durante el registro, del orden de 10 veces versus el control, mientras que en el grupo de animales con metástasis los peaks de ATP extracelular fueron más atenuados en el tiempo, del orden de 3 veces versus el control.

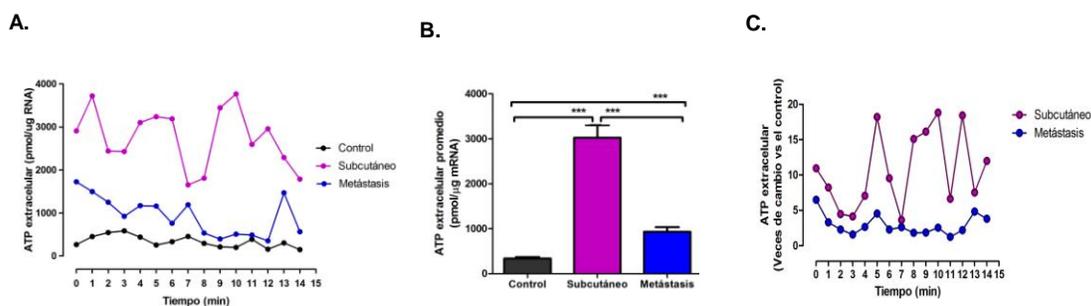


Figura 9. Niveles de ATP extracelular aumentados en fibras musculares de animales con cáncer

A. ATP extracelular en el tiempo. Control (n=4) Mín=149, Máx=585,9; Tumor Subcutáneo (n=4) Mín=1654, Máx=3767, Metástasis (n=4) Mín=353,2, Máx=1725.

B. ATP extracelular promedio (por grupo). Control (n=4) $337,9 \pm 34,9$; Tumor Subcutáneo (n=4) 3025 ± 278 , Metástasis (n=4) $933,5 \pm 103,7$. ANOVA de una vía, ***p<0,001.

C. ATP extracelular en el tiempo (veces de cambio versus el control). Control (n=4), Tumor Subcutáneo (n=4), Metástasis (n=4).

2.2 Cambio de Medio e Incubación con Carbenoxolona. La concentración de ATP extracelular depende de la cinética de los procesos intra y extracelulares. La liberación de ATP desde las fibras musculares en cultivo puede ser gatillada por un estímulo mecánico directo como el cambio de medio, de tal forma que se realizaron mediciones de ATP extracelular inmediatamente después del cambio de medio a Krebs tomando 8 puntos en el tiempo (Figura 10A). Posteriormente se realizó el mismo experimento pero las células se incubaron 30 minutos antes con CBX, un inhibidor del canal de Panexina 1 que media la liberación de ATP (Figura 10B). El resultado fue una mayor concentración de ATP extracelular en los cultivos de fibras de animales con tumor subcutáneo en comparación al control cuando se realizó la medición inmediatamente después del cambio de medio (Figura 10C; Prueba Mann Whitney, p<0,0001). Sin embargo, esta diferencia se perdió al incubar las fibras con CBX, lo que indicaría la participación de Panexina 1 en la liberación de ATP.

Al normalizar el ATP extracelular del tumor subcutáneo por el control, expresando los peaks de ATP como veces de cambio respecto a la actividad del control (Figura 10D). Se registró una mayor variación inmediatamente después de hacer

el cambio de medio al comienzo del registro, mientras que al incubar con CBX hubo una disminución drástica de estos peaks que fue del orden de 10 veces.

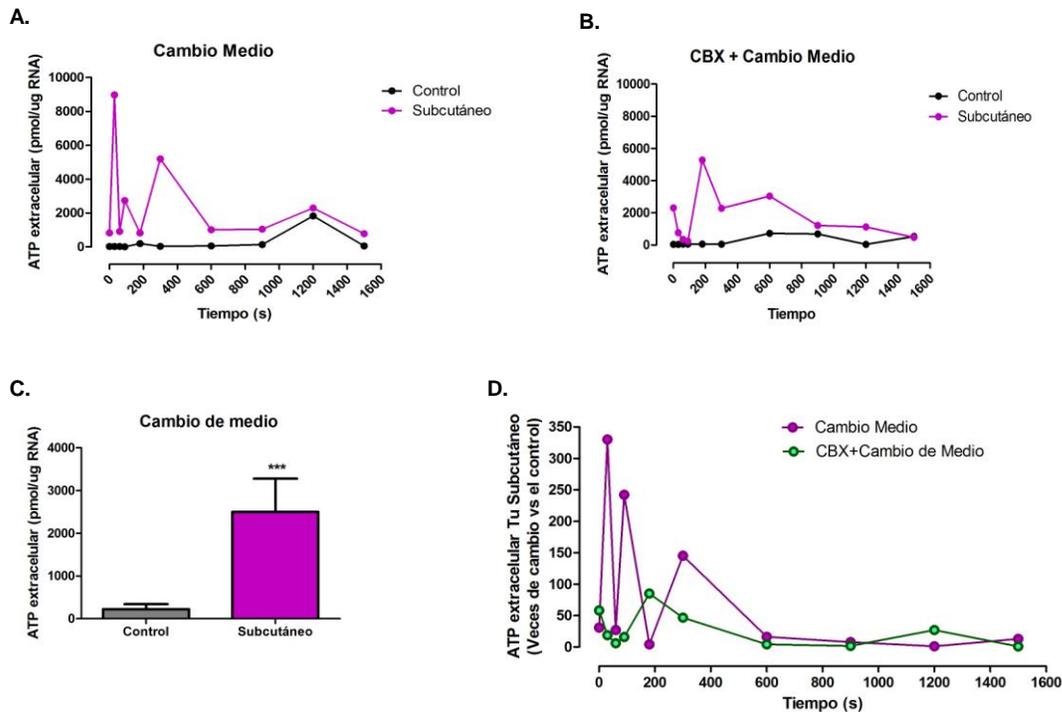


Figura 10. Efecto de la incubación de fibras musculares con CBX en el ATP extracelular

- A. ATP extracelular en el tiempo frente el cambio de medio**
- B. ATP extracelular en el tiempo al preincubar con CBX**
- C. Cambio de medio.** Control (n=3) 223,4 ± 161,4; Tumor Subcutáneo (n=5) 2723 ± 809,1. Prueba Mann Whitney, ***p<0,0001.
- D. ATP extracelular en el tiempo (veces de cambio versus el control).** Control n=3, Subcutáneo n=5, registro en el tiempo de la actividad promedio.

2.3 Expresión de Receptores Purinérgicos P2Y. Dado que el contenido extracelular de ATP fue mayor en el medio de cultivo de fibras musculares de ratones con cáncer, cabe esperar que este sea un estímulo para una expresión diferencial de genes para receptores purinérgicos del tipo P2Y según lo descrito en el modelo de nuestro laboratorio. Al analizar en condiciones basales el mRNA de los distintos receptores P2Y, la exposición a un mayor contenido de ATP extracelular no indujo cambios en el contenido total de mRNA de los receptores P2Y (Figuras 11A-G).

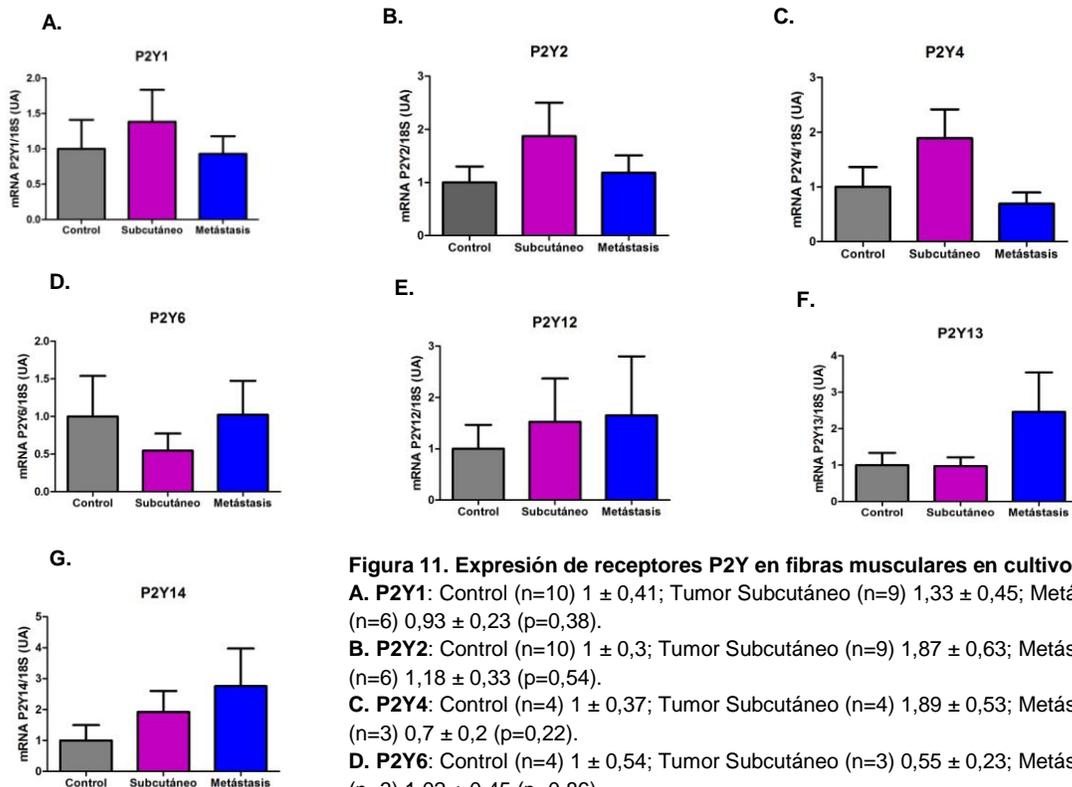


Figura 11. Expresión de receptores P2Y en fibras musculares en cultivo

A. P2Y1: Control (n=10) $1 \pm 0,41$; Tumor Subcutáneo (n=9) $1,33 \pm 0,45$; Metástasis (n=6) $0,93 \pm 0,23$ (p=0,38).

B. P2Y2: Control (n=10) $1 \pm 0,3$; Tumor Subcutáneo (n=9) $1,87 \pm 0,63$; Metástasis (n=6) $1,18 \pm 0,33$ (p=0,54).

C. P2Y4: Control (n=4) $1 \pm 0,37$; Tumor Subcutáneo (n=4) $1,89 \pm 0,53$; Metástasis (n=3) $0,7 \pm 0,2$ (p=0,22).

D. P2Y6: Control (n=4) $1 \pm 0,54$; Tumor Subcutáneo (n=3) $0,55 \pm 0,23$; Metástasis (n=3) $1,02 \pm 0,45$ (p=0,86).

E. P2Y12: Control (n=3) $1 \pm 0,47$; Tumor Subcutáneo (n=4) $1,53 \pm 0,84$; Metástasis (n=4) $1,65 \pm 1,15$ (p=0,95).

F. P2Y13: Control (n=9) $1 \pm 0,34$; Tumor Subcutáneo (n=7) $0,98 \pm 0,24$; Metástasis (n=7) $2,46 \pm 1,08$ (p=0,5).

G. P2Y14: Control (n=3) $1 \pm 0,5$; Tumor Subcutáneo (n=4) $1,92 \pm 0,68$; Metástasis (n=4) $2,75 \pm 1,22$ (p=0,68).

3. ATP y expresión de genes.

3.1 Expresión de IL-6. Un gen que se encuentra río abajo en la señalización de ATP en fibras musculares es IL-6. Una citoquina vinculada al proceso de atrofia que podría presentar una expresión diferencial dado el mayor contenido de ATP en el medio extracelular y en respuesta a éste como sucede durante la contracción muscular. Se utilizaron cultivos de fibras musculares aisladas que se estimularon con distintas dosis de ATP, posterior a una hora se extrajo el mRNA para obtener cDNA mediante q-PCR. Para comparar las veces de cambio en la expresión de IL-6 se utilizó el valor promedio de delta Ct normalizado contra el gen 18S en condiciones basales. Al estimular las fibras musculares aisladas con ATP a

distintas dosis se observó un incremento en el contenido de mRNA de IL-6 en los tres grupos (efecto de la dosis, ANOVA de dos vías, $p=0,0002$). El mayor efecto del ATP en el contenido de mRNA de IL-6 se alcanzó a $100 \mu\text{M}$ tanto en el grupo control como en el grupo con metástasis en comparación al basal respectivamente (Figura 12; ANOVA de una vía, $\#p<0,05$). En el caso de los animales con tumor subcutáneo se observó un aumento en la expresión de IL-6 a $10 \mu\text{M}$ de ATP. En términos cuantitativos no hubo diferencias en condiciones basales entre los tres grupos, y los peaks en el contenido de RNA de IL-6 fueron similares entre los grupos.

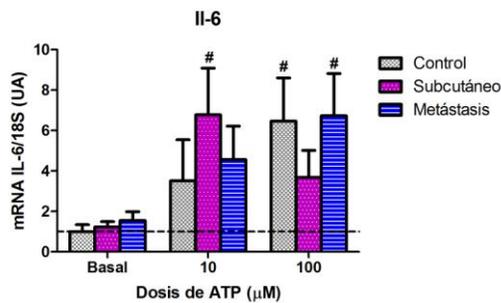


Figura 12. Fibras musculares en cultivo estimuladas con ATP

Basal. Control (n=11) $1 \pm 0,35$; Tumor Subcutáneo (n=11) $1,24 \pm 0,26$; Metástasis (n=16) $1,56 \pm 0,44$.

10 μM de ATP. Control (n=7) $3,51 \pm 2,04$; Tumor Subcutáneo (n=10) $6,78 \pm 2,31$; Metástasis (n=8) $4,57 \pm 1,65$. Efecto significativo respecto al basal, ANOVA de una vía, $\#p<0,05$.

100 μM de ATP. Control (n=6) $6,46 \pm 2,14$; Tumor Subcutáneo (n=6) $3,68 \pm 1,34$; Metástasis (n=7) $6,73 \pm 2,01$. Efecto significativo respecto al basal, ANOVA de una vía, $\#p<0,05$.

3.2 Atrogenes. La atrofia en el músculo esquelético en presencia de enfermedades crónicas como el cáncer ha sido asociada a una mayor degradación proteica, debido a la activación de la vía del proteosoma. Los genes responsables de inducir la vía del proteosoma, llamados atrogenes, se midieron en fibras musculares de FDB de ratones con cáncer en condiciones basales. En cultivos de fibras musculares aisladas se extrajo el mRNA para obtener cDNA mediante q-PCR. Para comparar las veces de cambio en la expresión del gen de interés se utilizó el valor promedio de delta Ct normalizado contra el gen 18S en condiciones basales. El contenido de mRNA de Atrogina (Figura 11A) y Murf1 (Figura 11B), no presentó diferencias significativas al comparar con el control ($p>0,05$). En este caso lo esperado era una mayor expresión de los atrogenes. Sin embargo, es posible que este no sea el principal mecanismo que dé cuenta de la atrofia observada en condiciones de cáncer.

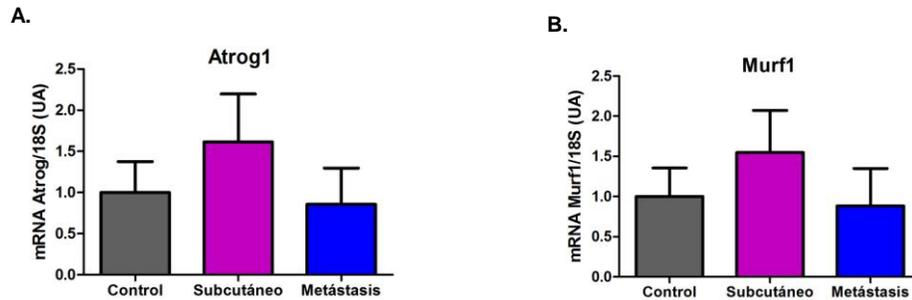


Figura 13. Expresión de genes de atrofia en fibras musculares en cultivo.

A. Atrogina. Control (n=6) $1 \pm 0,38$; Tumor Subcutáneo (n=5) $1,61 \pm 0,58$; Metástasis (n=3) $0,86 \pm 0,44$ ($p=0,41$).

B. Murf1. Control (n=6) $1 \pm 0,35$; Tumor Subcutáneo (n=5) $1,55 \pm 0,52$; Metástasis (n=3) $0,88 \pm 0,47$ ($p=0,56$).

3.3 Genes de Apoptosis. El ATP ha sido propuesto como una molécula que media la apoptosis en distintos modelos celulares. De acuerdo a los resultados obtenidos, las fibras musculares de ratones con cáncer liberan basalmente más ATP que las fibras de ratones control. Al estimular las fibras con ATP se obtuvo un incremento del contenido de mRNA de IL-6, un citoquina cuyo gen se encuentra abajo en la señalización por ATP.

La siguiente interrogante fue saber si la célula sensa el estímulo de ATP como una señal apoptótica que podría vincularse a la atrofia en este modelo. Para ello se utilizaron cultivos de fibras musculares en condiciones basales y estimuladas con ATP a distintas dosis. Posterior a una hora de incubación se extrajo el mRNA. La expresión de BIM un gen proapoptótico se determinó mediante q-PCR, se observó un aumento dosis dependiente en el contenido de mRNA de BIM en los tres grupos (efecto de la dosis, ANOVA de dos vías, $p=0,0007$). En el caso de los animales con tumor subcutáneo y metástasis, la aplicación de ATP provocó un aumento en la expresión de BIM que fue significativo con $10 \mu\text{M}$ en relación a los respectivos basales (Figura 14, ANOVA de una vía, $\#p<0,05$; $\#\#p<0,01$).

Además a $10 \mu\text{M}$ de ATP el grupo con tumor subcutáneo mostró un aumento significativo en el contenido de mRNA de BIM respecto al control (Figura 14, ANOVA de dos vías, $*p<0,05$). No se observaron diferencias entre los grupos en condiciones basales y tampoco a $100 \mu\text{M}$ de ATP.

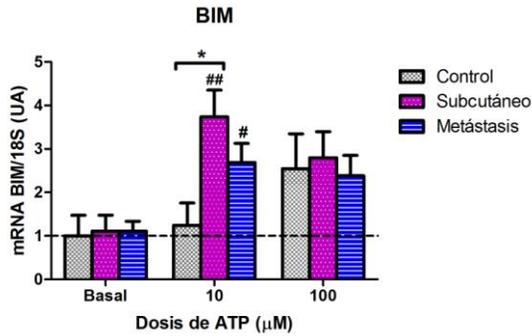


Figura 14. Expresión de BIM en fibras musculares estimuladas con ATP

Basal. Control (n=6) $1 \pm 0,47$; Tumor Subcutáneo (n=7) $1,1 \pm 0,37$; Metástasis (n=12) $1,1 \pm 0,23$.

10 μM de ATP. Control (n=4) $1,24 \pm 0,51$; Tumor Subcutáneo (n=10) $3,73 \pm 0,62$; Metástasis (n=11) $2,7 \pm 0,44$. Efecto significativo respecto al basal, ANOVA de una vía, #p<0,05, ##p<0,01. Efecto significativo respecto al control, ANOVA de dos vías, *p<0,05.

100 μM de ATP. Control (n=5) $2,55 \pm 0,8$; Tumor Subcutáneo (n=7) $2,8 \pm 0,6$; Metástasis (n=10) $2,4 \pm 0,47$.

Otro gen proapoptótico de interés es PUMA, el cual fue analizado en fibras musculares en condiciones basales y posteriores al estímulo con ATP. El contenido de mRNA de PUMA aumentó en forma dosis dependiente en comparación al basal en los grupos analizados (efecto de la dosis, ANOVA de dos vías, p=0,02). En el grupo con metástasis hubo un incremento en el mRNA de PUMA a 10 μM de ATP que fue estadísticamente significativo respecto al basal (Figura 15, ANOVA de una vía, #p<0,05). No se observaron diferencias en los basales y tampoco a 100 μM de ATP en ninguno de los grupos.

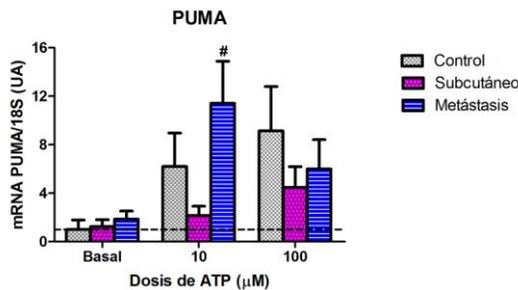


Figura 15. Expresión de PUMA en fibras musculares en cultivo estimuladas con ATP

Basal. Control (n=5) $1 \pm 0,79$; Tumor Subcutáneo (n=4) $1,25 \pm 0,57$; Metástasis (n=10) $1,86 \pm 0,66$.

10 μM de ATP. Control (n=5) $6,2 \pm 2,77$; Tumor Subcutáneo (n=5) $2,15 \pm 0,77$; Metástasis (n=9) $11,42 \pm 3,47$. Significativo respecto al basal, ANOVA de una vía, #p<0,05.

100 μM de ATP. Control (n=4) $9,15 \pm 3,66$; Tumor Subcutáneo (n=4) $4,47 \pm 1,73$; Metástasis (n=6) $6 \pm 2,42$.

Un tercer gen proapoptótico analizado en las fibras musculares fue Bax, nuevamente en condición basal y bajo el estímulo de ATP. En este caso particular al estimular con ATP no varió el contenido de mRNA de Bax en ninguna de las condiciones, ya sea respecto al basal o al comparar entre grupos (Figura 16).

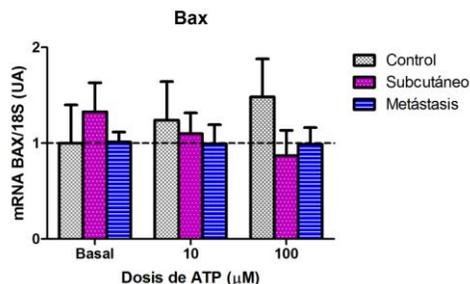


Figura 16. Expresión de Bax en fibras musculares en cultivo estimuladas con ATP

Basal. Control (n=6) $1 \pm 0,4$; Tumor Subcutáneo (n=11) $1,33 \pm 0,3$; Metástasis (n=12) $1,01 \pm 0,1$.

10 μM de ATP. Control (n=4) $1,24 \pm 0,4$; Tumor Subcutáneo (n=12) $1,1 \pm 0,22$; Metástasis (n=11) $0,99 \pm 0,2$.

100 μM de ATP. Control (n=5) $1,48 \pm 0,4$; Tumor Subcutáneo (n=7) $0,87 \pm 0,26$; Metástasis (n=10) $0,98 \pm 0,17$.

Posteriormente se realizó el análisis de un gen antiapoptótico Bcl-2, en condiciones basales y al estimular con ATP los cultivos de fibras musculares. A diferencia de los otros genes, la variación observada en el contenido de mRNA de Bcl-2 se debió a la condición de cada grupo estudiado (efecto de la condición respecto al control, ANOVA de dos vías, $p < 0,0001$). Al comparar entre grupos, el grupo con metástasis mostró un mayor contenido de mRNA basal y con la dosis de 100 μM de ATP en comparación al grupo control respectivamente (Figura 17, ANOVA de una vía $*p < 0,05$; ANOVA de dos vías $**p < 0,01$).

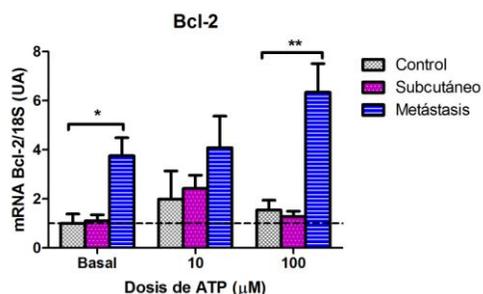


Figura 17. Expresión de Bcl-2 en fibras musculares en cultivo estimuladas con ATP

Basal. Control (n=6) $1 \pm 0,38$; Tumor Subcutáneo (n=7) $1,1 \pm 0,25$; Metástasis (n=12) $3,75 \pm 0,73$. Efecto significativo respecto al control, ANOVA de una vía, $*p < 0,05$.

10 μM de ATP. Control (n=4) $1,98 \pm 1,15$; Tumor Subcutáneo (n=8) $2,42 \pm 0,54$; Metástasis (n=9) $4,08 \pm 1,29$.

100 μM de ATP. Control (n=5) $1,54 \pm 0,4$; Tumor Subcutáneo (n=7) $1,28 \pm 0,22$; Metástasis (n=10) $6,34 \pm 1,17$. Efecto significativo respecto al control, ANOVA de dos vías, $**p < 0,01$.

3.3 Razón Bax/Bcl-2. Finalmente se empleó la razón entre los genes Bax/Bcl-2 como índice de actividad apoptótica en las fibras musculares. En este caso se debe considerar que el gen Bax no presentó variación entre los grupos basalmente y tampoco al estimular con ATP, por lo que la principal fuente de variación dependió del contenido de mRNA de Bcl-2 (efecto de la condición respecto al control, ANOVA de dos vías, $p = 0,0072$). La razón mostró que la

expresión de genes apoptóticos se encuentra disminuida en el grupo con metástasis en comparación al control cuando se estimuló con 100 μM de ATP, dado el alto contenido de mRNA de Bcl-2 que se genera en el grupo con metástasis a esa dosis (Figura 18, ANOVA de una vía, $*p < 0,05$). El grupo con tumor subcutáneo no mostró diferencias significativas respecto al control.

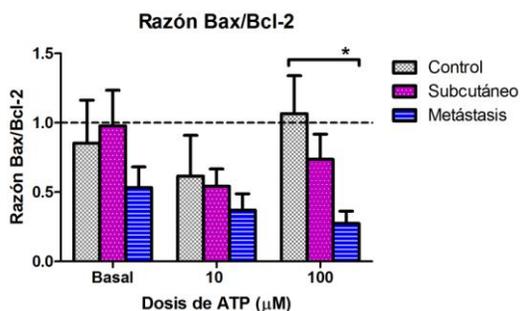


Figura 18. Razón entre la expresión de los genes Bax/Bcl-2.

Basal. Control (n=6) 0,85 \pm 0,31; Tumor Subcutáneo (n=7) 0,98 \pm 0,26; Metástasis (n=12) 0,53 \pm 0,15.

10 μM de ATP. Control (n=3) 0,62 \pm 0,3; Tumor Subcutáneo (n=12) 0,54 \pm 0,12; Metástasis (n=10) 0,37 \pm 0,12.

100 μM de ATP. Control (n=5) 1,07 \pm 0,27; Tumor Subcutáneo (n=7) 0,74 \pm 0,18; Metástasis (n=10) 0,27 \pm 0,1. Efecto significativo respecto al control, ANOVA de dos vías, $*p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los animales con cáncer por melanoma constituyen un modelo para el estudio de la atrofia muscular y el compromiso sistémico en condiciones de enfermedad, observándose muchos de los deterioros descritos en humanos. Existen variadas alternativas de modelos para el estudio del deterioro muscular por cáncer, y se puede considerar que un modelo válido es aquel que reproduce la mayoría de las características descritas en humanos. Sin embargo, debido a las diferencias interespecie no existe un modelo animal que reúna todos estos aspectos (Bennani-Baiti & Walsh 2011). En relación a los resultados observados; el modelo de tumor subcutáneo se caracterizó por atrofia, disminución de la fuerza, aumento del peso a expensas del tumor, anemia y bioquímica sanguínea alterada. Todos estos indicadores afirman la validez del modelo a emplear en este estudio y son compatibles con los criterios clínicos descritos en humanos de deterioro debido al cáncer. El modelo de metástasis no fue descrito en su totalidad, sin embargo dado el tiempo de exposición al cáncer (21 días) y el compromiso sistémico por la metástasis de varios órganos (pulmones, bazo, intestino, hígado) fue incluido en este estudio. En el modelo de metástasis se empleó la vía de diseminación venosa para la formación de tumores en distintos órganos del animal, mientras que el ensayo de tumor subcutáneo se asoció a una inyección subcutánea de células tumorales en el flanco del animal. Si bien en este modelo es más reproducible el tumor ya que se circunscribe a la zona inoculada, es más agresivo ya que el animal no tolera un plazo superior a 15 días, ya sea porque experimenta sufrimiento que está limitado desde el punto de vista ético y debe ser sacrificado, o bien porque el animal muere espontáneamente si no es sacrificado en la fecha. No obstante, en el modelo de metástasis pese a ser menos controlada la implantación de las células tumorales en los distintos órganos, permite un tiempo de exposición al tumor mayor en los animales y consecuentemente también permite analizar mecanismos compensatorios de más larga data.

Un hallazgo importante en el modelo de tumor subcutáneo fue la atrofia muscular que es compatible con el deterioro asociado a la enfermedad. El músculo tibial anterior se caracteriza por el predominio de fibras rápidas, relacionado con una

abundante masa muscular en base al contenido de proteínas estructurales. En este caso se encontró una disminución de la proteína sarcomérica alfa actina un marcador habitual de atrofia (Jackman & Kandarian 2004; Eley & Tisdale 2007). Dada la alta variabilidad de las proteínas utilizadas como control de carga particularmente en el grupo con tumor subcutáneo, se empleó el carril completo de proteínas de la membrana teñido con azul de coomassie para normalizar los resultados.

Un parámetro que permite el seguimiento de pacientes con cáncer y determina su pronóstico es la baja de peso. Si bien los animales no mostraron baja de peso en este estudio, la aparente ganancia de peso en el grupo con tumor subcutáneo fue a expensas de la masa tumoral. En el caso de los animales con metástasis el peso de los animales no varió después del ensayo (21 días), en comparación a los animales del grupo control, por lo tanto la presencia del cáncer puede interferir con el desarrollo normal del organismo generando un estancamiento en el peso. Estas variaciones del peso observadas en este modelo podrían ampliar el criterio actual para valorar el peso que sólo considera la baja.

En relación a la evaluación funcional mediante el *Hanging Wire Test*, el tiempo de agarre en suspensión fue menor en el grupo de animales con tumor subcutáneo versus el grupo control. Cabe destacar que el grupo control no mostró mejoría en su rendimiento dado que el tiempo entre una evaluación y la siguiente no generó una adaptación a la prueba. El rendimiento alcanzado por el grupo con tumor subcutáneo pudo estar condicionado por la presencia de la masa tumoral en uno de los flancos del tronco, influyendo posiblemente en el desempeño motor de los animales en la prueba. Por otro lado el menor tiempo de agarre de estos animales puede estar en relación con la atrofia muscular. Si bien la atrofia descrita en el músculo tibial anterior corresponde a la pata posterior del animal, y la fuerza de agarre es un indicador directo de la fuerza de las patas delanteras, estos datos en conjunto van en la misma dirección apoyando la idea de la atrofia muscular y el deterioro sistémico por la presencia del cáncer. Por lo tanto esta prueba es una buena herramienta de seguimiento dado su carácter global, pero resulta

inespecífica para atribuir sólo a la atrofia el bajo desempeño en el tiempo de agarre.

Las pruebas sanguíneas y bioquímicas realizadas con la sangre de los animales permitieron objetivar el compromiso sistémico en el grupo de tumor subcutáneo en comparación al control. Si bien la atrofia está presente también en modelos por desuso o ingravidez (Ikemoto et al. 2001; Magne et al. 2011), la diferencia fundamental radica en el deterioro global del animal en un contexto de una enfermedad crónica subyacente. Por lo tanto se desconoce si al revertir las condiciones de la enfermedad se puede llegar a recuperar la masa muscular como ocurre clásicamente en los otros modelos de atrofia. Dicha reversión escapa por ahora a los objetivos de este estudio, por el momento la primera pregunta que surge va dirigida a entender los mecanismos que están detrás de la pérdida de masa muscular en condiciones de enfermedad, en estadios tempranos antes de llegar al punto de no retorno que caracteriza a la caquexia en las etapas finales del cáncer (Whitman et al. 2005).

Uno de los puntos centrales como objetivo de la tesis fue explorar el rol del ATP como molécula de señalización en la fibra muscular en condiciones de cáncer. El ATP que se produce en el interior de la célula puede ser liberado al medio extracelular por distintos mecanismos, en el caso de la fibra muscular nuestro laboratorio ha demostrado que este proceso está gobernado por el acoplamiento excitación-transcripción, donde participarían proteínas de membrana como el Receptor de Dihidropiridinas (Cav1.1), y el canal de Panexina 1 que media la salida regulada de ATP al espacio extracelular (Jorquera et al. 2013; Valladares et al. 2013; Bustamante et al. 2014). El ATP extracelular depende del balance entre su liberación y degradación evento mediado por ectonucleotidasas (Moro et al. 1997) que se encuentran en el exterior del sarcolema. Uno de los hallazgos de este estudio fue detectar mayores concentraciones extracelulares de ATP en el medio de cultivo, en un tiempo de registro establecido a partir de 30 minutos post cambio de medio, para establecer similares condiciones de medición entre las fibras musculares de cada grupo. El contenido de ATP detectado presentó una gran variación en el caso de los animales con tumor subcutáneo, mientras que los

animales con metástasis presentaron una menor fluctuación en la medición punto a punto. Puesto que la gran variación presentaba una tendencia o línea de base, al comparar cada grupo en su actividad promedio se obtuvo que los animales con tumor subcutáneo y con metástasis tenían un contenido de ATP extracelular significativamente mayor a los animales controles (Corriden & Insel 2011). Esto amerita un análisis posterior, ya que por una parte podría estar incrementada la liberación de ATP al medio extracelular, o bien la tasa de degradación de ATP podría ser menor.

En base a esta premisa analizamos la liberación de ATP desde la fibra muscular. Este proceso puede ser regulado por distintas vías, una de estas a través del canal de Panexina-1 (Chekeni et al. 2010; Sandilos et al. 2012). Este canal puede ser inhibido mediante CBX y probenecid, ambos actúan a nivel de canales formados por panexinas (Jorquera et al. 2013). Al evaluar la participación de Panexina-1 en la salida de ATP, en células preincubadas con CBX por 30 minutos, pudimos determinar que en presencia del inhibidor hubo una menor liberación de ATP en las fibras provenientes de animales con tumor subcutáneo en comparación al control inmediatamente después de aplicar un estímulo mecánico directo (cambio de medio). Este experimento nos sugiere que una parte del mecanismo que participa en la regulación del ATP, es decir la liberación de ATP al medio extracelular, se encuentra alterado en las fibras de los animales con cáncer, vía Panexina-1.

El ATP como molécula en el espacio extracelular cumple un papel de señalización que ha sido descrito en múltiples tipos celulares (Burnstock et al. 2013). Particularmente en el músculo esquelético el ATP se une a receptores purinérgicos ubicados en la membrana que pueden ser del tipo P2Y, y que median señales a través de la formación de IP3 provocando incrementos citosólicos y nucleares de Ca^{+2} lo que conlleva la expresión de genes como IL-6 (Burnstock et al. 2013; Jorquera et al. 2013; Bustamante et al. 2014). En esta misma línea el contenido de mRNA de los receptores purinérgicos P2Y se analizó en condiciones basales en cultivos de fibras musculares aisladas, para determinar si había alguna

variabilidad debido a las altas concentraciones de ATP extracelular, pero no se encontraron diferencias.

Un gen descrito río abajo en la señalización por ATP es el gen de IL-6. La citoquina IL-6 ha sido descrita como una molécula que puede provocar efectos beneficiosos en condiciones de ejercicio (Zhang et al. 2013). Pero que en condiciones de enfermedad e inflamación media el catabolismo a nivel del músculo y da cuenta de la atrofia que se produce en estos modelos (Carson & Baltgalvis 2011; Washington et al. 2012). Particularmente en este estudio, se observó que al estimular las fibras musculares con una dosis baja de 10 μ M se ATP aumentó el contenido de mRNA de IL-6 en el grupo con tumor subcutáneo en relación a su basal, mientras que esta misma respuesta se logró a 100 μ M de ATP en los grupos control y con metástasis. Al parecer la presencia de mayores concentraciones de ATP en el medio extracelular determina una lectura distinta de la célula al recibir la dosis de ATP agregada. El grupo de animales con tumor subcutáneo liberó más ATP al medio extracelular y además produjo más mRNA de IL-6 con una dosis baja, a diferencia del grupo con Metástasis que liberó menos ATP al extracelular y sólo incrementó la expresión de la citoquina con 100 μ M de ATP.

Como ha sido señalado, el catabolismo proteico es la principal característica del deterioro muscular presente en estados avanzados del cáncer (Muscaritoli et al. 2010; Sakuma & Yamaguchi 2012). La vía clásica de atrofia muscular que ha sido más descrita en modelos de atrofia depende de la actividad del proteosoma, cuya activación está vinculada a los genes de atrofia llamados atrogenes, *atrogina-1* y *murf1* (Acharyya & Ladner 2004; Lecker et al. 2006; Lenk et al. 2010). En este estudio se esperaba encontrar una mayor expresión de los atrogenes, de acuerdo a lo descrito en la mayoría de los modelos de atrofia. Sin embargo, la actividad basal de estos genes no presentó diferencias en comparación al control. Desconocemos si la actividad de la vía del proteosoma como tal ya se encuentra funcionando, lo que podría explicar un menor contenido en el mRNA de los atrogenes. Sin embargo, según lo descrito en otros modelos ambos componentes

se encuentran igualmente afectados (Acharyya & Ladner 2004; Lecker et al. 2006).

Este hallazgo dio pie a indagar en la actividad de los genes apoptóticos, empleando el ATP como estímulo. Dos de los genes proapoptóticos estudiados, BIM y PUMA mostraron un incremento dosis dependiente, que fue significativo a 10 μ M de ATP en el grupo con metástasis respecto al basal. En el grupo con tumor subcutáneo el incremento en el contenido de BIM fue significativo respecto al basal y al grupo control a 10 μ M de ATP. Un gen clave en la actividad apoptótica es Bax (Marzetti, Lees, et al. 2012; Marzetti, Calvani, et al. 2012), el cual no mostró cambios en su contenido basal y tampoco bajo el estímulo del ATP (Bossola et al. 2006).

Por otro lado el gen antiapoptótico Bcl-2 mostró incrementos que fueron significativos en el grupo con metástasis a 100 μ M de ATP y también en condiciones basales respecto al control. Mientras que el grupo con tumor subcutáneo no presentó diferencias en el contenido de mRNA de dicho gen. Resumiendo, el grupo con metástasis aumentó el contenido del mRNA de genes apoptóticos BIM y PUMA con una dosis baja de 10 μ M de ATP, mientras que en condiciones basales y con una dosis más alta de 100 μ M de ATP aumentó la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2. En el grupo de animales con tumor subcutáneo no se encontraron diferencias con el control excepto en la actividad de BIM a 10 μ M de ATP como se señaló anteriormente. Si bien ambos modelos presentan características distintas desde el punto de vista del desarrollo del cáncer y el grado de compromiso del organismo, podríamos señalar que poseen similar actividad los genes estudiados basalmente, excepto Bcl-2 en el caso del grupo con metástasis que podría dar cuenta de algún efecto protector en el músculo cuando aumenta el tiempo de exposición al cáncer (ensayo de 21 días). Respecto a la respuesta al ATP se observó una dualidad; por una parte predominó la actividad de los genes apoptóticos con una dosis baja de ATP, sin embargo con una dosis alta se vio incrementado el contenido del gen antiapoptótico.

Al normalizar la expresión del gen Bax en relación a Bcl-2, se observó que en condiciones basales no hubo diferencias en la razón en relación al control, sin

embargo a 100 μM de ATP el grupo con metástasis presentó un índice menor de actividad apoptótica en comparación al control que fue estadísticamente significativo. El ATP en una concentración alta (100 μM) podría influir en el músculo como una molécula que activaría un gen antiapoptótico facilitando posiblemente un mecanismo protector (Agteresch et al. 2000; White et al. 2009; Valladares et al. 2013). Si consideramos que el modelo de metástasis tuvo un mayor tiempo de exposición al cáncer, es posible que esto se asocie a una mayor actividad de genes antiapoptóticos en el músculo esquelético, lo que podría explicar en parte la larga resistencia al deterioro que presenta este tejido, antes que se detecten los cambios irreversibles asociados a la caquexia como ocurre en el cáncer en estadios finales (Busquets et al. 2007; Penna et al. 2011). Por otra parte cabe recordar que la fibra muscular a diferencia de otras células posee múltiples núcleos en su matriz, haciendo que la apoptosis tenga características diferentes en el músculo esquelético donde participaría más de un núcleo en una misma célula (Adhietty & Hood 2003).

Entre los principales hallazgos del modelo de tumor subcutáneo podemos concluir que es un modelo que reúne los criterios de deterioro descritos en humanos, es decir atrofia, pérdida de fuerza y compromiso sistémico. Además hay una alteración en la señalización por ATP que sería mediada en parte por el canal de Panexina-1; por una parte la célula libera más ATP al espacio extracelular y al aplicar el ATP en dosis baja de 10 μM aumenta la expresión de IL-6 y de BIM.

CONCLUSIONES

El presente estudio se enmarcó en la descripción de un modelo de cáncer, específicamente los efectos en el músculo esquelético como un órgano clave en el deterioro generado por la patología de base. Exploramos un posible mecanismo que puede explicar el deterioro muscular basado en la señalización extracelular por ATP. A nivel basal se encuentran alterados los niveles extracelulares de ATP, que es mayor en las fibras musculares de los animales con cáncer. El ATP extracelular produce efectos como una mayor expresión de algunos genes particularmente IL-6, siendo esta citoquina una de las principales responsables de la inflamación a nivel sistémico.

El ATP indujo la actividad de genes de apoptosis en el músculo de ratones con cáncer, aumentando la expresión de BIM y PUMA en relación a su basal. Sin embargo, no se observaron diferencias en el caso de Bax. Por otra parte se analizó la actividad del gen antiapoptótico Bcl-2, obteniéndose una mayor expresión al estimular con dosis altas de ATP en relación al basal.

Estos resultados nos permiten concluir que el ATP es liberado basalmente en mayor cantidad en el músculo de ratones con cáncer; esto es compatible con una respuesta diferencial en la expresión de genes pro apoptóticos y pro inflamatorios. Esta señalización podría ser uno de los mecanismos que da cuenta de la atrofia observada en el cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, E., 2003. ATP in the treatment of advanced cancer. *Current topics in Membranes ...*, 54, pp.415–451. Available at: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf> [Accessed March 24, 2014].
- Acharyya, S. & Ladner, K., 2004. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *Journal of Clinical Investigation*, 114(3). Available at: <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/114/3/370> [Accessed March 23, 2014].
- Adihetty, P. & Hood, D., 2003. Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. *Basic Applied Myology*, (2), pp.171–179. Available at: <http://www.bio.unipd.it/bam/PDF/13-4/03509Adhilhetty.pdf> [Accessed March 24, 2014].
- Agteresch, H.J. et al., 2000. Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(4), pp.321–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675381>.
- Bennani-Baiti, N. & Walsh, D., 2011. Animal models of the cancer anorexia-cachexia syndrome. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 19(9), pp.1451–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714754> [Accessed January 20, 2012].
- Bonetto, A. et al., 2012. JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 303(3), pp.E410–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22669242> [Accessed June 12, 2013].
- Bossola, M. et al., 2006. Skeletal muscle apoptosis is not increased in gastric cancer patients with mild-moderate weight loss. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(9), pp.1561–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697691> [Accessed July 29, 2013].
- Burnstock, G., Arnett, T.R. & Orriss, I.R., 2013. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic signalling*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23943493> [Accessed August 20, 2013].
- Busquets, S. et al., 2007. Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*,

26(5), pp.614–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17688974> [Accessed July 29, 2013].

Bustamante, M. et al., 2014. Electrical stimulation induces interleukin-6 in skeletal muscle through extracellular ATP, by activating Ca²⁺ signals and an interleukin-6 autocrine loop. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. Available at: <http://ajpendo.physiology.org/highwire/citation/149716/mendeley>.

Carson, J.A. & Baltgalvis, K.A., 2011. Interleukin-6 as a Key Regulator of Muscle Mass during Cachexia. *Muscle Biology*, 38(4), pp.168–176.

Casas, M. et al., 2010. IP 3 -dependent , post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *The Journal of General Physiology*, pp.455–467.

Chekeni, F., Elliott, M. & Sandilos, J., 2010. Pannexin 1 channels mediate/induce signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 467(7317), pp.863–867. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v467/n7317/abs/nature09413.html> [Accessed March 24, 2014].

Clarke, B. a et al., 2007. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism*, 6(5), pp.376–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17983583> [Accessed March 23, 2014].

Corriden, R. & Insel, P., 2011. Basal Release of ATP: An Autocrine-Paracrine Mechanism for Cell Regulation. *Science Signaling*, 3(104), pp.1–25.

Eley, H.L. & Tisdale, M.J., 2007. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. *The Journal of biological chemistry*, 282(10), pp.7087–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213191> [Accessed March 23, 2014].

Evans, W.J. et al., 2008. Cachexia: a new definition. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 27(6), pp.793–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18718696> [Accessed March 1, 2012].

Evans, W.J., 2010. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity 1–3. *Am J Clin Nutr*, 91(Cachexia), pp.1123–1127.

Fernández-Verdejo, R. et al., Exercise Sensitizes Skeletal Muscle to Extracellular ATP for IL-6 Expression in Mice. *Int J Sports Med*, (EFirst).

- Fitz, J.G., 2007. Regulation of cellular ATP release. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 118, pp.199–208. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1863605&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Garg, A.D. et al., 2012. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO journal*, 31(5), pp.1062–79. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3298003&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed June 17, 2013].
- Garg, A.D. et al., 2010. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et biophysica acta*, 1805(1), pp.53–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720113> [Accessed June 4, 2013].
- Haddad, F. et al., 2005. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(3), pp.911–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542570> [Accessed August 15, 2011].
- Ikemoto, M. et al., 2001. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin–proteasome pathway. *The FASEB Journal*, pp.1279–1281. Available at: <http://www.fasebj.org/content/15/7/1279.short> [Accessed March 23, 2014].
- Jackman, R.W. & Kandarian, S.C., 2004. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology. Cell physiology*, 287(4), pp.C834–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355854>.
- Jorquera, G. et al., 2013. Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of cell science*, 126(Pt 5), pp.1189–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23321639> [Accessed March 23, 2014].
- Juretic, N. et al., 2005. Depolarization-induced slow Ca²⁺ transients stimulate transcription of IL-6 gene in skeletal muscle cells Depolarization-induced slow Ca²⁺ transients stimulate transcription of IL-6 gene in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, (December 2005).
- Kelly, M. et al., 2004. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochemical and biophysical research communications*, 320(2), pp.449–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15219849> [Accessed April 1, 2012].
- Kelly, M. et al., 2009. of AMP-Activated Protein Kinase by Interleukin-6 in Rat Skeletal Muscle Association With Changes in cAMP, Energy State, and

- Endogenous Fuel Mobilization. *Diabetes*, (May). Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/58/9/1953.short> [Accessed March 23, 2014].
- Krysko, D. V et al., 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(12), pp.860–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151605> [Accessed May 24, 2013].
- Krysko, O. et al., 2013. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell death & disease*, 4, p.e631. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681226> [Accessed May 22, 2013].
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L. & Mitch, W.E., 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(7), pp.1807–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738015> [Accessed March 22, 2014].
- Lenk, K., Schuler, G. & Adams, V., 2010. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 1(1), pp.9–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3060644&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed March 23, 2014].
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> [Accessed March 19, 2014].
- Lobos-González, L. et al., 2011. Advances in Malignant Melanoma – Clinical and Research Perspectives. In A. W. Armstrong, ed. *cdn.intechopen.com*. pp. 189–214. Available at: http://cdn.intechopen.com/pdfs/20097/InTech-Caveolin_1_in_melanoma_progression.pdf [Accessed March 24, 2014].
- Magne, H. et al., 2011. Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *The Journal of physiology*, 589(Pt 3), pp.511–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3055540&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed June 18, 2013].
- Marshall, O.J., 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(15), pp.2471–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073005> [Accessed March 23, 2014].

- Marzetti, E., Calvani, R., et al., 2012. Apoptosis in skeletal myocytes: a potential target for interventions against sarcopenia and physical frailty - a mini-review. *Gerontology*, 58(2), pp.99–106. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952604> [Accessed June 5, 2013].
- Marzetti, E., Lees, H. a, et al., 2012. Skeletal muscle apoptotic signaling predicts thigh muscle volume and gait speed in community-dwelling older persons: an exploratory study. *PloS one*, 7(2), p.e32829. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3289676&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed July 15, 2013].
- Michael J.Tisdale, 2002. CACHEXIA IN CANCER PATIENTS. *Nature reviews. Genetics*, 3(11), pp.883–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415318> [Accessed March 14, 2012].
- Moro, G., Saborido, A. & Megi, A., 1997. cascade for degradation of extracellular ATP. , 907, pp.899–907.
- Muscaritoli, M. et al., 2010. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 29(2), pp.154–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060626> [Accessed May 24, 2013].
- Nicolson, G.L., Brunson, K.W. & Fidler, I.J., 1978. Specificity of Arrest , Survival , and Growth of Selected Metastatic Variant Cell Lines Specificity of Arrest , Survival , and Growth of Selected Metastatic. , pp.4105–4111.
- Penna, F. et al., 2011. Combined approach to counteract experimental cancer cachexia: eicosapentaenoic acid and training exercise. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2(2), pp.95–104. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3118004&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed March 23, 2014].
- Putten, M. Van, 2014. The use of hanging wire tests to monitor muscle strength and condition over time. , (Id), pp.1–12.
- Ravichandran, K.S., 2011. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*, 35(4), pp.445–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3241945&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed August 7, 2013].
- Sakuma, K. & Yamaguchi, A., 2012. Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 3(2), pp.77–94. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3374017&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed May 29, 2013].

Sandilos, J.K. et al., 2012. Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. *The Journal of biological chemistry*, 287(14), pp.11303–11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322839&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed October 16, 2013].

Scheller, J. & Rose-John, S., 2006. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical microbiology and immunology*, 195(4), pp.173–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741736> [Accessed March 5, 2012].

Valladares, D. et al., 2013. Electrical stimuli are anti-apoptotic in skeletal muscle via extracellular ATP. Alteration of this signal in Mdx mice is a likely cause of dystrophy. *PloS one*, 8(11), p.e75340. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3839923&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed March 20, 2014].

Washington, T. & White, J., 2011. Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 202(4), pp.657–669. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-1716.2011.02281.x/full> [Accessed March 24, 2014].

White, J.P. et al., 2012. IL-6 regulation on skeletal muscle mitochondrial remodeling during cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. *Skeletal muscle*, 2(1), p.14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3431229&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed July 29, 2013].

White, N. et al., 2009. An in vivo model of melanoma: treatment with ATP. *Purinergic signalling*, 5(3), pp.327–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2717314&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed July 29, 2013].

Whitham, M. et al., 2012. Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1. *The Journal of biological chemistry*, 287(14), pp.10771–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322851&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed July 19, 2013].

Whitman, S. a et al., 2005. Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 450(6), pp.437–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952031> [Accessed July 29, 2013].

Wolsk, E. et al., 2010. IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 299(5), pp.E832–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823453> [Accessed June 5, 2013].

Zhang, C. et al., 2013. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *The Journal of biological chemistry*, 288(3), pp.1489–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184935> [Accessed May 23, 2013].