



Universidad Nacional Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

Regulación de la expresión génica de *miostatina* inducida por IGF-1 mediada por el factor de transcripción CREB durante la diferenciación de los mioblastos

Proyecto de Tesis presentado como parte de los requisitos para optar al Grado de **Magíster en Biotecnología**.

Director de Tesis:

Dr. Juan Valdés Muñoz

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Andrés Bello

Rodrigo Ignacio Zuloaga Royo

Santiago, Chile

Mayo de 2013



Universidad Nacional Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

“Regulación de la expresión génica de *miostatina* inducida por IGF-1 mediada por el factor de transcripción CREB durante la diferenciación de los mioblastos”

Rodrigo Ignacio Zuloaga Royo

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del director de tesis Dr. Juan Valdés Muñoz, en el laboratorio de Bioquímica Celular de la Universidad Nacional Andrés Bello y aprobado por los miembros de la comisión de seguimiento.

Dr. Juan Valdés Muñoz
Director de Tesis

Dr. Enrique Jaimovich P.
Comisión de Tesis

Dr. Alfredo Molina S.
Comisión de Tesis

Santiago, Chile

Mayo de 2013

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT 11090274, a la Universidad Nacional Andrés Bello (UNAB DI-31/11R) y al Fondo de Financiamiento de Centros de Investigación en Áreas Prioritarias (FONDAP 15110027) por financiar la realización del trabajo.

También, quisiera dar las gracias a mi director de Tesis el Dr. Juan Valdés por aceptarme en el desarrollo de la tesis, el gran apoyo que me entregó desde los inicios de la carrera hasta formarme como investigador, en la orientación necesaria para seguir avanzando en el trabajo y por brindarme toda su ayuda y confianza en todo momento. Conjuntamente, a mi comisión de seguimiento compuesta por el Dr. Alfredo Molina y al Dr. Enrique Jaimovich que contribuyeron con propuestas y comentarios que permitieron mejorar la tesis.

Por supuesto, como olvidar a todos mis amigos y compañeros de laboratorio (aquellos que se encuentran actualmente y a quienes emprendieron rumbo) que han estado para subirme el ánimo cuando muchas veces no resultaban los experimentos, permitiéndome seguir adelante. Además, agradezco a la Dra. Cristina Navarro, al Dr. Gino Nardocci, a Sylvia Flores, a Diego Safian y al Dr. Eduardo Fuentes quienes tuvieron toda la disposición y paciencia para responder todas mis inquietudes, ya sea en la estrategia experimental, disertaciones o en la redacción del escrito.

Finalmente, quiero agradecer de manera muy especial a mis padres Begoña Royo y Rodolfo Zuloaga por el constante esfuerzo, la confianza en mis capacidades, por estar siempre conmigo y entregarme todo para ser quien soy ahora. A mis hermanos Gabriela y Felipe por ser una parte fundamental en mi vida, ayudarme a superar los momentos difíciles y a disfrutar de los logros obtenidos. Por último, a mis padrinos Paulina Royo y Armando Méndez, y mis primas Daniela y Camila por estar siempre preocupados de mí, que de alguna manera participaron durante el proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE DE CONTENIDOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ABREVIATURAS	
I. RESUMEN	9
II. ABSTRACT	10
III. INTRODUCCIÓN	11
3.1 <i>Miogénesis</i>	11
3.2 <i>El factor de crecimiento análogo a insulina 1 (IGF-1)</i>	12
3.3 <i>Vías de señalización reguladas por IGF-1 y el rol del factor de transcripción CREB</i>	13
3.4 <i>Miostatina</i>	17
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	21
5.1 <i>Objetivo general</i>	21
5.2 <i>Objetivos específicos</i>	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 <i>Cultivos celulares</i>	22
6.2 <i>Tratamientos con IGF-1 recombinante e inhibidores farmacológicos</i>	22
6.3 <i>Extracción proteínas totales y Western Blot</i>	23
6.4 <i>Construcción vectores reporteros</i>	24

6.5 <i>Transfección transiente de vector reportero y RNA interferente pequeño</i>	26
6.6 <i>Ensayo reportero de luciferasa</i>	26
6.7 <i>Extracción RNA total y RT-qPCR</i>	27
6.8 <i>Análisis de resultados</i>	28
VII. RESULTADOS	29
7.1 <i>IGF-1 induce la activación de CREB</i>	29
7.2 <i>Distintas vías de señalización participan en la activación de CREB</i>	31
7.3 <i>Construcción de vector reportero para el promotor de miostatina</i>	36
7.4 <i>IGF-1 induce la expresión génica de miostatina</i>	38
7.5 <i>Distintas vías de señalización, activadas por IGF-1, estimulan la expresión génica de miostatina</i>	40
VIII. DISCUSIÓN	48
IX. CONCLUSIÓN	58
X. BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la miogénesis esquelética regulada por IGF-1 y Miostatina.....	12
Figura 2: Músculo de la extremidad anterior de ratones normales y transgénicos MLC/migf-1 de 6 meses	13
Figura 3: Vía de señalización de Miostatina.....	18
Figura 4: Alineamiento de un fragmento de la secuencia promotora de miostatina en diversas especies.....	20
Figura 5: IGF-1 induce la activación de CREB	30
Figura 6: La vía de IGF-1R/PI3K participa en la activación de CREB.....	32
Figura 7: Las vías MEK-ERK1/2 y p38-MAPK participan en la activación de CREB	33
Figura 8: La vía de PLC/IP ₃ participa en la activación de CREB	34
Figura 9: Las proteínas quinasas dependientes de calcio PKC y CaMK participan en la activación de CREB	35
Figura 10: Clonamiento del promotor para <i>miostatina</i> de rata	37
Figura 11: IGF-1 induce la expresión génica de <i>miostatina</i>	39
Figura 12: La vía de IGF-1R/PI3K, activada por IGF-1, estimula la expresión génica de <i>miostatina</i>	42
Figura 13: Las vías MEK-ERK1/2 y p38-MAPK, activadas por IGF-1, estimulan la expresión génica de <i>miostatina</i>	43
Figura 14: La vía de PLC/IP ₃ , activada por IGF-1, estimula la expresión génica de <i>miostatina</i> .	44
Figura 15: Las proteínas quinasas dependientes de calcio PKC y CaMK, activadas por IGF-1, estimulan la expresión génica de <i>miostatina</i>	45
Figura 16: El factor de transcripción CREB regula la expresión génica de <i>miostatina</i>	47
Figura 17: Modelo de las vías de señalización activadas por IGF-1 que activan a CREB en la regulación génica de <i>miostatina</i>	57

ABREVIATURAS

°C: Grados Celcius

A_{260/280}: Absorbancia 260/280

BSA: Albumina de suero bovino (**B**ovine **S**erum **A**lbumin)

CaCl₂: Cloruro de Calcio

CO₂: Dióxido de Carbono

DMEM-F12: Medio Eagle Modificado de Dulbecco con Mezcla de nutrientes F12 (**D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium: **N**utrient **M**ixture **F**-12)

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (**D**eoxyribonucleic **Á**cid)

DTT: Ditiotreititol

ECL: Quimioluminiscencia electrogenerada (**E**lectrogenerated **C**hemiluminiscence)

EDTA: Etilendiamnotetracético

FBS: Suero fetal de bovino (**F**etal **b**ovine **s**erum)

HCl: Ácido clorhídrico.

HRP: Peroxidasa de rábano picante (**H**orseradish **p**eroxidase)

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

kb: Kilobases

kDa: KiloDalton

LB: Caldo Lisógeno (**L**ysogeny **B**roth)

mA: MiliAmpere

mg: Miligramo

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

min: Minutos

ml: Mililitro

mM: Milimolar

mm: Milimetro

MOPS: 3-Morfolinopropano-1-ácido sulfónico (3-(**N**-**m**orpholino) **P**ropanesulfonic **Á**cid)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (**M**essenger **R**ibonucleic **Á**cid)

NaCl: Cloruro de sodio

Na₃VPO₄: Ortovanadato de sodio

NaF: Fluoruro de sodio.

NCBI: Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)

ng: Nanógramo

nM: Nanómolar

NP-40: Nonil-fenoxipolietoxiletano

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600

pb: Pares de bases

PBS: Tampon Fosfato Salino (**Phosphate Buffered Saline**)

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena (**Polymerase Chain Reaction**)

RPM: **R**evoluciones **P**or **M**inuto

RT: Transcripción Reversa (**R**everse **T**ranscription)

SAP: Fosfatasa Alcalina de Camarón (**S**hrimp **A**lcaline **P**hosphatase)

SDS: **D**odecil **S**ulfato de **S**odio (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate)

seg: Segundos

TAE: Tris, Ácido acético y EDTA

TBS-T: Tampón Tris Salino (**T**ris **B**uffered **S**aline)-**T**ween-20 0,1 % v/v

U: Unidades

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µM: Micromolar

v/v: Volumen/volumen

x g: RCF (Fuerza centrifuga relativa)

Xgal: 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactosido

I. RESUMEN

La miogénesis es el proceso encargado de la determinación y formación de las células del tejido muscular. El programa miogénico involucra varios pasos como la proliferación y diferenciación de las células musculares, etapas que son reguladas por señales extracelulares como el factor de crecimiento análogo a insulina 1 (IGF-1) y Miostatina. IGF-1 es un regulador positivo de la proliferación y diferenciación muscular, mientras que Miostatina regula negativamente estos procesos. IGF-1 ejerce sus funciones activando vías de señalización como MAPK, PI3K/Akt o PLC γ /IP $_3$ que regulan la actividad de factores de transcripción promiogénicos como CREB. Análisis *in silico* de la región promotora de *miostatina* revelaron regiones conservadas para la unión del factor de transcripción CREB, sugiriendo fuertemente que la expresión de *miostatina* puede ser regulada por la vía de señalización IGF-1-CREB. Considerando estos antecedentes, se postuló la siguiente hipótesis de trabajo: **durante la diferenciación de los mioblastos, IGF-1 regula la expresión génica de *miostatina* mediante la activación del factor de transcripción CREB.**

Para corroborar esta hipótesis, se estudió el efecto de diversas concentraciones de IGF-1 (fisiológicas, subfisiológicas y suprafisiológicas) en la activación de CREB y en la regulación de la expresión génica de *miostatina*, mediante las técnicas western blot, vector reportero y RT-qPCR. Adicionalmente mediante la utilización de inhibidores farmacológicos específicos se logró diseccionar las vías de señalización que participan en la activación de CREB así como la expresión de *miostatina*. Complementariamente se utilizó RNA interferente pequeño para CREB para evaluar su efecto en la expresión génica de *miostatina*. Los resultados sugieren que IGF-1 induce la activación de CREB así como la expresión génica de *miostatina* a través de variadas vías de señalización entre las que destacan la MAPKs y PI3K/PLC γ /IP $_3$. Esta última involucrada en la liberación de calcio y posiblemente en la activación de proteínas dependientes de calcio como PKC y CaMK. En conclusión, IGF-1 regula la diferenciación de los mioblastos activando diversas vías de señalización que convergen en la activación de CREB e inducen la expresión génica de *miostatina*, un regulador negativo de la diferenciación de mioblastos.

La información obtenida de este proyecto contribuirá significativamente a ampliar el conocimiento acerca de la miogénesis y desarrollo muscular, teniendo aplicaciones potenciales en el campo de la biotecnología biomédica.

II. ABSTRACT

Myogenesis is the process responsible of the determination and formation of muscle tissue cells. The myogenic program involves several steps as the proliferation and differentiation of muscle cells, steps which are regulated by extracellular signals as insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and Myostatin. IGF-1 is a positive regulator of muscle proliferation and differentiation, whereas Myostatin negatively regulates these processes. IGF-1 exerts its functions activating signaling pathways as MAPK, PI3K/Akt or PLC γ /IP $_3$ that regulate the activity of pro-myogenic transcription factors as CREB. *In silico* analysis of *myostatin* promoter region revealed conserved regions for binding of transcription factor CREB, strongly suggesting that *myostatin* expression can be regulated for the signaling pathway IGF-1-CREB. Considering this background, it was postulated the following working hypothesis: **during myoblasts differentiation, IGF-1 regulates *myostatin* gene expression through activation of transcription factor CREB.**

To test this hypothesis, it was studied the effect of various concentrations of IGF-1 (subphysiological, physiological and supraphysiological) in the activation of CREB and regulation of *myostatin* gene expression, through western blot, reporter vector and RT-qPCR techniques. Further by utilizing specific pharmacological inhibitors was achieved dissect the signaling pathways that participate in the activation of CREB as well as the *myostatin* gene expression. Additionally small interfering RNA for CREB was used to evaluate their effect on *myostatin* gene expression. The results suggest that IGF-1 induces the activation of CREB as well as *myostatin* gene expression through various signaling pathway among which stand MAPKs and PI3K/PLC γ /IP $_3$ signaling pathways. The latter involved in calcium release and possibly the activation of calcium-dependent proteins as PKC and CaMK. In conclusion, IGF-1 regulates myoblasts differentiation activating of different signaling pathways converging in the activation of CREB and inducing *myostatin* gene expression, a negative regulator of myoblasts differentiation.

The information obtained in this project will contribute significantly to broadening knowledge about myogenesis and muscle development, with potential applications to biomedical field of biotechnology.

III.INTRODUCCIÓN

3.1 Miogénesis

Se define miogénesis como el proceso de determinación y formación de las células del tejido muscular. Este proceso se encuentra conservado entre los vertebrados (Biresi *et al.*, 2007). Comienza en la embriogénesis estableciendo el patrón muscular básico de un organismo y continúa en el desarrollo fetal y neonatal del individuo, etapa crítica para el crecimiento y maduración del tejido muscular. También durante la vida adulta contribuyendo al crecimiento postnatal y en la reparación de tejido muscular dañado (Chargé y Rudnicki, 2004; Grand y Rudnicki, 2007).

Indistintamente del tipo de miogénesis (embrionaria, fetal o adulta) se pueden distinguir las siguientes 4 fases: activación, proliferación, diferenciación y fusión (**Figura 1**). Las células progenitoras musculares se activan por diferentes factores de transcripción miogénicos para iniciar la proliferación (Pax7, Myf5, MyoD y Pax3). Posteriormente, los factores Miogenina y MyoD detienen el ciclo celular de los mioblastos y activan la diferenciación para formar los miotubos, aunque algunos quedan en estado quiescente en el músculo esquelético maduro (células satélites). Finalmente, Miogenina y MRF4 permiten que los miotubos se fusionen y se formen las miofibras (Grand y Rudnicki, 2007).

La miogénesis es un proceso complejo que se encuentra regulada por distintas moléculas efectoras, entre los que podemos destacar a los factores de crecimiento análogos a insulina (IGFs), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), los factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) y los factores de crecimiento transformantes- β (TGF- β) (Charge y Rudnicki, 2004). Dentro de los factores de crecimiento señalados, se han identificado dos proteínas que se expresan de manera dinámica durante prácticamente todas las etapas en el desarrollo del individuo de forma autocrina/paracrina, y que han demostrado ser esenciales, en regular positiva y negativamente la miogénesis: IGF-1 y Miostatina, respectivamente (Clemmons, 2009; Jouliakaza y Cabello, 2006).

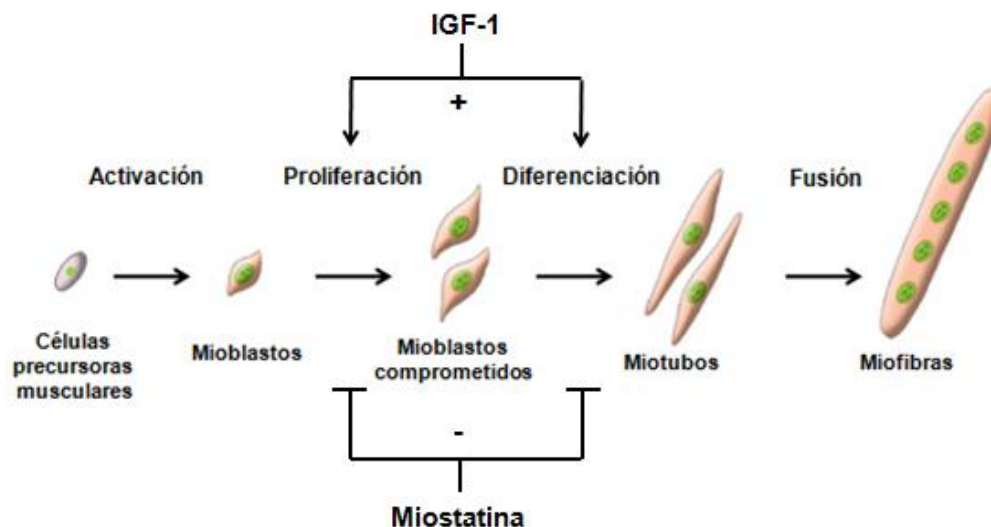


Figura 1: Esquema de la miogénesis esquelética regulada por IGF-1 y Miostatina (modificado de Grand y Rudnicki, 2007).

3.2 El factor de crecimiento análogo a insulina 1 (IGF-1)

IGF-1 también conocido como Somatomedina C, es una hormona polipeptídica de estructura similar a la insulina el cual juega un importante rol durante las fases de desarrollo de distintos órganos y tejidos. Esta proteína presente en la circulación sanguínea, se sintetiza en el hígado y localmente en el músculo (Clemmons, 2009; Philipou *et al.*, 2007).

IGF-1 es sintetizada como una pre-pro-hormona la cual experimenta al menos dos eventos de procesamiento: corte del péptido señal y procesamiento del péptido C-terminal (Denley *et al.*, 2005; Musaro *et al.*, 2001; Philipou *et al.*, 2007). Primeramente el mRNA de *igf-1* es procesado diferencialmente para generar distintos transcritos mediante: múltiples sitios de inicio transcripcionales, splicing alternativo y diferentes señales de poliadenilación. Estos transcritos se traducirán en diversas isoformas del precursor de IGF-1, los cuales difieren en el tamaño de la secuencia amino-terminal (péptido señal) y la estructura del péptido de extensión (péptido E). Después el precursor es modificado post-traduccionalmente por el corte proteolítico del péptido señal y el péptido E para formar IGF-1 activo de 7.6 kDa. El péptido maduro es secretado al torrente sanguíneo y se asocia a las proteínas de unión a IGF (IGFBPs) para estimular el crecimiento en distintos tejidos (Denley *et al.*, 2005; Musaro *et al.*, 2001; Philipou *et al.*, 2007).

La acción de IGF-1 sobre la célula muscular es variada, puede desencadenar respuestas tanto de proliferación como de diferenciación en mioblastos mediante la activación de diferentes

vías de señalización intracelulares (Clemmons, 2009; Musaro y Rosenthal, 1999; Philipou *et al.*, 2007; Rodgers, 2005). En líneas de células musculares se ha determinado que la administración exógena de IGF-1 estimula la proliferación celular y subsecuentemente potencia la diferenciación miogénica (Engert *et al.*, 1996).

En el músculo esquelético adulto, IGF-1 participa en diferentes procesos. A nivel fisiológico, IGF-1 provoca el aumento de la masa muscular y la regeneración del tejido (Musaro *et al.*, 2001). En ratones transgénicos que sobreexpresan localmente la isoforma “Factor mecánico de crecimiento” de IGF-1 en el músculo esquelético (MLC/mifg-1), presentaron un incremento en la masa muscular por hipertrofia (**Figura 2**) (Musaro *et al.*, 2001). Por otro lado, IGF-1 inhibe la degradación de las proteínas producto de la desnutrición, inflamación o atrofia muscular, indicando que IGF-1 puede ser usado como una herramienta para mejorar el daño ocasionado por diversas miopatías (Clemmons, 2009; Bodine *et al.*, 2001; Latres *et al.*, 2005).

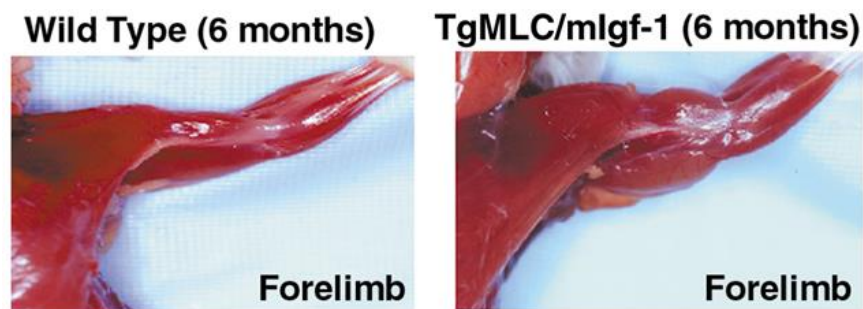


Figura 2: Músculo de la extremidad anterior de ratones normales y transgénicos MLC/mifg-1 de 6 meses (Musaro *et al.*, 2001).

3.3 Vías de señalización reguladas por IGF-1 y el rol del factor de transcripción CREB

La actividad biológica de IGF-1 está mediada a través de su receptor de membrana (IGF-1R). Los receptores para IGF-1 son tetrámeros compuestos de dos subunidades alfa extracelulares donde se une el ligando, y dos subunidades beta intracelulares con actividad tirosina-quinasa. La unión del ligando produce la interacción de las dos subunidades del receptor y la autofosforilación en tirosinas de la subunidad beta, lo cual proporciona actividad quinasa. El primer suceso es la fosforilación en tirosinas de las proteínas IRS (Sustrato del receptor de insulina). La fosforilación en tirosinas de IRS forma sitios de anclaje para proteínas que contienen en su estructura dominios SH2 (homología Src), las que se asocian con la activación de

conocidas cascadas de transducción de señales activadas por factores de crecimiento, tales como la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Clemmons, 2009; Rommel *et al.*, 2001; Sarbassov y Peterson, 1998).

La PI3K es una enzima heterodimérica compuesta por dos subunidades: una subunidad reguladora de 85 kDa (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa (p110). La cascada de señalización de PI3K empieza con el reclutamiento de su subunidad p85, que posee dominios SH2, y la posterior activación de su subunidad catalítica p110 (Sun *et al.*, 2004). Se ha observado que al interferir en la actividad de PI3K usando el inhibidor LY294002, se genera el bloqueo de la formación de microtubos y de la expresión de proteínas músculo específicas, razón por la cual se considera esencial en la miogénesis (Xu y Wu, 2000). Una vez activada, PI3K fosforila al fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), produciendo fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) y creando sitios de unión a lípidos en la membrana celular para la proteína serina/treonina quinasa Akt (también conocida como proteína quinasa B, PKB) la cual transloca hacia la membrana para ser fosforilada y activada por la quinasa PDK-1 (Latres *et al.*, 2005). Akt fosforilada (pAkt) directa o indirectamente conduce a la activación de mTOR (blanco mamífero de Rapamicina), una serina/treonina quinasa que estimula la síntesis proteica, regulando río abajo la fosforilación de p70S6K y 4E-BP1, implicados en el inicio de la traducción y en la etapa de elongación de la cadena polipeptídica (Bodine *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha descrito que pAkt puede activar a otras proteínas blanco entre las que se encuentran factores de transcripción pro-miogénicos como CREB (Sun *et al.*, 2004). Se ha descrito en cultivos de cardiomiocitos que la administración de IGF-1 genera un efecto anti-apoptótico activando las vías de señalización PI3K/Akt y MEK-ERK 1/2 promoviendo la fosforilación de CREB (Maldonado *et al.*, 2005; Mehrhof *et al.*, 2001).

Por otra parte, la unión de IGF-1 a su receptor provoca la fosforilación de la proteína homóloga a Src y colágeno (proteína SHC), en sus residuos de tirosina, uniéndose al complejo compuesto por GRB (proteína de unión al receptor del factor de crecimiento) y SOS (hijo de *sevenless*), proteínas que promueven el reemplazo de GDP por GTP en la proteína Ras, produciendo su activación (Cargnello y Roux, 2011). Además, Ras corresponde a una proteína G que provoca la activación de RAF, una serina/treonina quinasa, que una vez activada puede fosforilar a la serina/treonina quinasa MEK, la cual presenta 2 principales isoformas, MEK1 y MEK2 (Adi *et al.*, 2002; Cargnello y Roux, 2011). Ambas participan en la activación de quinasas

de respuestas extracelulares 1/2 (ERK1/2), donde regulan la actividad de varios factores de transcripción, entre los que destaca el factor de transcripción CREB (Leloup *et al.*, 2007; Pérez-Ruiz *et al.*, 2007). En particular, se ha observado en miotubos que la despolarización activa la vía MEK-ERK1/2 induciendo la fosforilación del factor de transcripción CREB (Carrasco *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2001).

Una tercera vía de señalización activada por IGF-1 y con una participación relevante durante la miogénesis es la vía PI3K-fosfolipasa C γ (PLC γ)-Inositol trifosfato (IP $_3$). Se determinó recientemente a partir de experimentos realizados por el grupo de laboratorio que IGF-1 induce la liberación de calcio desde reservorios intracelulares a través de la activación de la vía IP $_3$ en mioblastos durante la diferenciación muscular (Valdés *et al.*, 2012). Esta vía implica la participación de las proteínas PI3K, PLC γ y el receptor de IP $_3$ (IP $_3$ R). El incremento de calcio se presentó de manera transitoria observándose tanto en el núcleo como en el citoplasma. El aumento máximo de la fluorescencia se produjo a los 10 segundos después de agregar IGF-1 (Valdés *et al.*, 2012). Es así como se ha asociado la participación de vías dependientes de calcio/IP $_3$ en procesos asociados proliferación, diferenciación y fusión de miotubos (Abbott *et al.*, 1998; Allen y Leinward 2002; Friday *et al.*, 2000; O'Connor *et al.*, 2005; Semsarian *et al.*, 1999). Complementariamente, en miotubos C2C12 se determinó que IGF-1 activa proteínas dependientes de calcio como la fosfatasa Calcineurina (CaN) y la proteína quinasa dependiente del complejo calmodulina/calcio (CaMK) para regular la activación de CREB y de ese modo modular la expresión del receptor de dihidropiridina (DHPR α 1s), una proteína que participa en la liberación de calcio durante la contracción muscular (Zheng *et al.*, 2004).

CREB (elemento de unión en respuesta a AMP cíclico) es una proteína de 43 kDa que se une a los sitios consenso CRE (elemento de respuesta a CREB) de los promotores. La secuencia CRE es muy conservada entre los vertebrados y suele ser palíndroma completa (TGACGTCA) o parte de ella (TGACG o CGTCA), aunque se han descrito otras variantes. CREB pertenece a la superfamilia de factores de transcripción bZIP, los cuales poseen un dominio carboxilo terminal básico tipo cierre de leucina para la unión del DNA, la localización nuclear y facilitar la dimerización tanto de homodímeros como de heterodímeros. Además, comparten un dominio de activación amino terminal (TAD), compuesto de 2 dominios ricos en glutamina (Q1 y Q2) y el dominio central inducido por quinasas (KID) que son necesarios para la activación de CREB (Altarejos y Montminy, 2011). Un análisis filogenético de DNA complementario (cDNA) desde

Caenorhabditis elegans a mamíferos observó un alto grado de conservación de los dominios bZIP y KID (Bito y Takemoto-Kimura, 2003). El dominio Q2 interactúa con el factor TAF4 (proteína de unión a TATA asociada al factor 4) lo que le permite la unión al complejo de transcripción de la RNA polimerasa II y en conjunto con el dominio bZIP son esenciales para la unión de CREB a la cromatina (Mayr *et al.*, 2005). Se han descrito que los coactivadores CBP/p300 (proteína de unión a CREB) y los CRTCs (coactivadores transcripcionales regulados por AMP cíclico) son capaces de unirse al dominio KID y bZIP, respectivamente, una vez que CREB sea fosforilado en el dominio KID en los residuos de serina, donde la unión es mediada por señales de calcio o AMP cíclico. La activación de CREB se produce principalmente en la fosforilación de la serina-133, evento central en la regulación de CREB. Sin embargo, se han descrito fosforilaciones en las serinas-142 y serina-143 que promueven una fuerte actividad transcripcional (Altarejos y Montminy, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, IGF-1 es capaz de regular los eventos de remodelación de la expresión génica durante la diferenciación de las células musculares. En los eventos de remodelación es necesaria la participación de los factores de transcripción, entre los cuales destaca la proteína CREB que estaría jugando un rol preponderante en la miogénesis (Altarejos y Montminy, 2011). Se ha descrito que ratones transgénicos que expresan un dominante negativo de CREB, manifestaron un fenotipo de distrofia muscular y una disminución en la actividad del factor promotor miogénico 2 (MEF2), indicando que CREB participa en la regulación de la diferenciación de la masa muscular (Berdeaux *et al.*, 2007). También, en embriones de ratones que carecen del gen CREB (*knock-out*) presentaron deformidades en su musculatura y una disminución en la expresión de distintos marcadores miogénicos, como *pax3*, *myod* y *myf5*. Además, se observó en explantes de mesoderma presomítico de ratón transducidos con un dominante-negativo de CREB, que éste factor de transcripción constituía un elemento esencial para regular la expresión génica de marcadores miogénicos inducidos por la vía Wnt (Chen *et al.*, 2005). Más aún, en un estudio reciente realizado en cultivo primario de mioblastos y en ratones con distrofia muscular (*mdx*) que presentaban una forma activa de CREB se demostró que ésta proteína es activada cuando se genera un daño en el tejido muscular, estimulando la proliferación de los mioblastos como también la expresión de factores de transcripción miogénicos y así promover la regeneración del músculo esquelético (Stewart *et al.*, 2011).

3.4 Miostatina

La Miostatina o también denominada factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF-8), es miembro de la superfamilia de factores de transformación y crecimiento TGF- β que ha sido analizada en distintos modelos de estudio, principalmente en ratones *knock-out* o en la administración exógena en cultivos celulares donde muestran su efecto inhibitorio en el desarrollo muscular (Joulia-Ekaza y Cabello, 2006; Langley *et al.*, 2002; McPherron *et al.*, 1997). Esta proteína es sintetizada en el músculo esquelético como un precursor de 376 aminoácidos conteniendo una secuencia señal en el dominio amino terminal, a continuación un propéptido denominado también como péptido asociado a la latencia (LAP), conformando un complejo inactivo. Luego, el LAP se escinde proteolíticamente en la secuencia RSRR del péptido biológicamente activo, de 26 kDa, que se encuentra en el dominio carboxilo terminal (Lee, 2004; McPherron *et al.*, 1997; Sharma, 1999).

Para ejercer su actividad biológica el péptido maduro debe unirse a receptores específicos, denominados receptores de activina tipo II (ActRIIA, ActRIIB) pertenecientes al grupo de los receptores con actividad serina/treonina quinasa. Estos receptores en ausencia de ligando homodimerizan en la superficie celular y en presencia de dímeros de Miostatina activa ocurre una transfosforilación mediada por su actividad serina/treonina quinasa, esta señal se traduce en fosforilaciones de proteínas Smad (R-Smads) que actúan como mediadores intracelulares. Se ha establecido que las Smad2/3 están involucradas en la vía de señalización de Miostatina. Estas proteínas después de activarse por fosforilación en su región C-terminal forman un complejo heteromérico con co-Smad4 y, a su vez, éste interactúa con co-activadores o co-represores permitiendo la activación o inhibición de la transcripción de genes músculo específicos (**Figura 3**) (Joulia-Ekaza y Cabello, 2006). La formación de los complejos Smad- coSmad son inhibidos por Smad7 y Smurf1 (Ebisawa *et al.*, 2001; Joulia-Ekaza y Cabello, 2006; Zhu *et al.*, 2004).

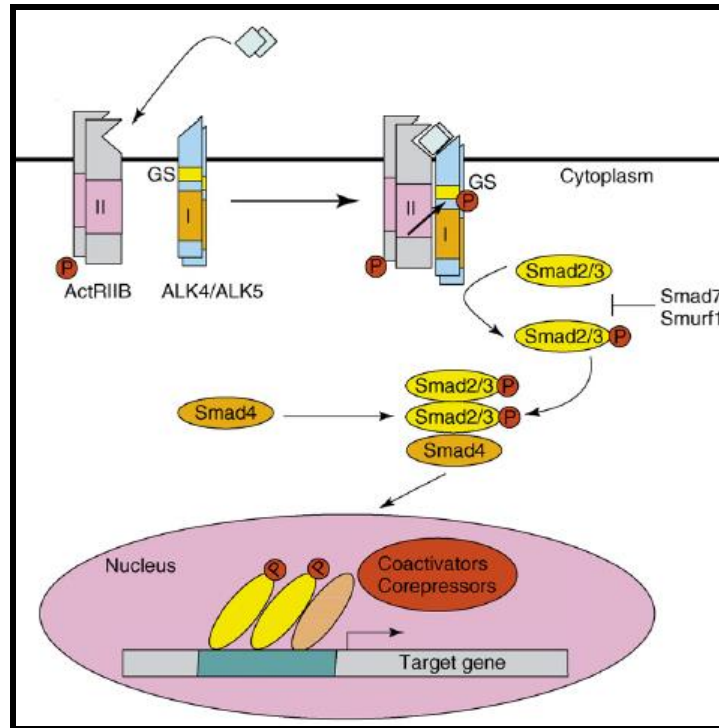


Figura 3: Vía de señalización de Miostatina (modificado de Joulia-Ekaza y Cabello, 2006).

Experimentos desarrollados *in vitro*, ya sea sobre expresando o inhibiendo la actividad de Miostatina, han aportado evidencia de la participación de esta proteína en la regulación del ciclo celular. En efecto, Miostatina induce la expresión de p21, proteína que inhibe la actividad del complejo ciclina E-Cdk2, generando la activación de la proteína del retinoblastoma (Rb) y por lo tanto, la detención del ciclo celular de los mioblastos en la fase G1. Así mismo, se ha establecido el papel que juega Miostatina en la diferenciación miogénica. Este proceso es gatillado por una señal de diferenciación, y en respuesta MyoD, activa la expresión de genes miogénicos incluyendo *miogenina* y *p21*, obteniéndose como resultado una acumulación de mioblastos que se van a fusionar en miotubos multinucleados (Joulia *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2000). Miostatina regula este proceso inhibiendo la expresión de MyoD vía Smad3 después de la señal de diferenciación, a causa de esto se pierde la expresión génica y la diferenciación miogénica (Langley *et al.*, 2002). Además se ha determinado que otras proteínas se encuentran involucradas en este mecanismo de acción de Miostatina, es así como una sobre expresión de ésta reduce significativamente la expresión de *miogenina* y aumenta la expresión de p53, proteína que regula negativamente el ciclo celular (Joulia *et al.*, 2003).

La estructura del gen de *miostatina* en mamíferos consta de tres exones y dos intrones, organización que también se conserva en otros vertebrados inferiores así como su región promotora (Grade *et al.*, 2009; Patel y Amthor, 2005). En estas especies la expresión de *miostatina* en embriones se detecta a temprana edad en el miotomo, compartimento que va a dar origen a los somitos, continuando posteriormente su expresión en músculo esquelético adulto (McPherron *et al.*, 1997). Recientemente, se ha demostrado que IGF-1 regula la expresión de *miostatina* en células musculares diferenciadas (Kurokawa *et al.*, 2009; Shyu *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2007). Al estimular células C2C12 con IGF-1 se induce un incremento en la expresión de Miostatina con efecto dependiente de la dosis, la cual puede ser revertida en presencia del inhibidor de la PI3K Wortmanina (Yang *et al.*, 2007). En cardiomiocitos de rata, IGF-1 induce la expresión de Miostatina mediante las vías de p38-MAPK y MEF2 (Shyu *et al.*, 2005). Un estudio realizado durante la diferenciación de mioblastos de pollo, IGF-1 induce la actividad promotora y la expresión del mRNA de *miostatina* (Kurokawa *et al.*, 2009). Resultados preliminares por el grupo de laboratorio demostró mediante RT-PCR semicuantitativo que IGF-1 incrementa la expresión génica de *miostatina* (Valdés *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce cuales vías de señalización están involucradas en el proceso.

Adicionalmente, se ha analizado la región promotora 5' río arriba para el gen de *miostatina* en diferentes organismos como bovino, porcino, oveja, pez cebra, humano y murino, las cuales comparten una considerable homología en la secuencia y poseen variados motivos conservados de unión a factores de transcripción (Allen y Du, 2008; Allen y Unterman, 2007; Deng *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2007; Salerno *et al.*, 2004; Spiller *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Un estudio reciente realizó un análisis *in silico* de la región promotora de *miostatina* en diversas especies y se observó que la región de CRE se encontraba evolutivamente conservada (**Figura 4**). Además, se analizó la región conservada de CRE del promotor de *miostatina* de ratón y de pollo mediante ensayo reportero de luciferasa en mioblastos C2C12 *in vitro* y reportero de GFP en somitos de pollo *in vivo* donde se demostró que esta región posee la actividad de un promotor proximal (Grade *et al.*, 2009).

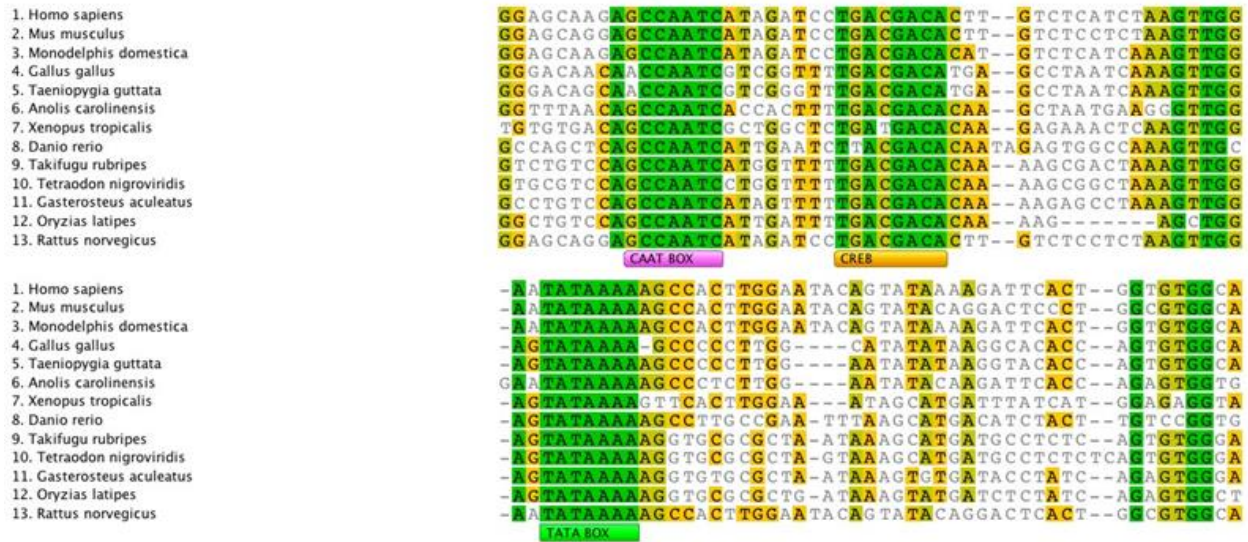


Figura 4: Alineamiento de un fragmento de la secuencia promotora de *miostatina* en diversas especies (modificado de Grade *et al.*, 2009).

Considerando que IGF-1 puede activar variadas vías de señalización que confluyen en la activación del factor de transcripción CREB, que IGF-1 es capaz de inducir la expresión de *miostatina* en células musculares y que adicionalmente se ha demostrado la existencia de secuencias consenso para la unión de CREB en el promotor de *miostatina* se postuló la siguiente hipótesis de trabajo: **durante la diferenciación de mioblastos, IGF-1 regula la expresión génica de *miostatina* mediante la activación del factor de transcripción CREB.**

Con el fin de corroborar esta hipótesis se estudiaron vías de señalización que participan en la regulación de la expresión génica de *miostatina* y en la activación de CREB en mioblastos estimulados con IGF-1, utilizando inhibidores farmacológicos específicos de las vías de señalización propuestas: las vías MAPKs MEK-ERK1/2 y p38-MAPK, y la vía PI3K/PLC/IP₃ que activa diferentes proteínas dependientes de calcio como PKC, CaMK y CaN. Además, se utilizó RNA interferente pequeño para CREB con objeto de evaluar su efecto en la expresión génica de *miostatina*. Complementariamente se analizó el efecto de diversas concentraciones de IGF-1 (fisiológicas, subfisiológicas y suprafisiológicas) en la expresión génica de *miostatina* y en la activación de CREB mediante las técnicas de western blot, vector reportero y RT-qPCR.

IV. HIPÓTESIS

“Durante la diferenciación de los mioblastos, IGF-1 regula la expresión génica de *miostatina* mediante la activación del factor de transcripción CREB”.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar las vías de señalización que participan en la regulación de la expresión génica de *miostatina* inducida por IGF-1 y mediado por el factor de transcripción CREB durante la diferenciación de los mioblastos.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la activación de CREB inducida por IGF-1 a concentraciones subfisiológicas, fisiológicas y suprafisiológicas durante la diferenciación de los mioblastos.
2. Determinar las vías de señalización de IGF-1 que inducen la activación de CREB durante la diferenciación de los mioblastos.
3. Definir las vías de señalización de IGF-1 que inducen la activación de CREB para regular la expresión génica de *miostatina* durante la diferenciación de los mioblastos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivos celulares

Para este trabajo, se utilizó como modelo miogénico cultivo primario de músculo esquelético de rata durante la fase de diferenciación. Se preparó el cultivo del músculo de los neonatos Sprague-Dawley, los cuales fueron adquiridos del vivero de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Todos los experimentos que se realizaron en este trabajo, contaron con la aprobación del comité de bioética de la Universidad Nacional Andrés Bello. Brevemente, los neonatos fueron anestesiados y luego sacrificados, se les disectó el tejido muscular de la extremidad posterior la cual se trató con colagenasa por 15 min a 37°C. Las células se sembraron sobre placas de cultivo de 35x10 mm (Falcon BD) y fueron cultivadas en medio de crecimiento DMEM-F12 (mezcla 1:1) con suero de bovino 10 %, FBS 2.5 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 10 mg/ml (Gibco, Invitrogen). Las células fueron mantenidas a 37°C en una estufa de cultivo con atmósfera húmeda y 5% de CO₂ (Shel Lab). Para detener el crecimiento de los mioblastos a fibroblastos, se añadió al medio citosina arabinosida (5 mM) 2 días después de realizar el plaqueo por 24 horas. Al día 3, los cultivos fueron diferenciados en un medio libre de suero y al día 4 se utilizaron para los experimentos (Valdés *et al.*, 2012).

6.2 Tratamientos con IGF-1 recombinante e inhibidores farmacológicos

Los cultivos en fase de diferenciación se trataron con IGF-1 recombinante de rata (R&D System, Minneaolis, MN) en concentraciones subfisiológicas (2 nM), fisiológicas (10 nM) y suprafisiológicas (50 nM) a distintos tiempos para determinar la concentración y el tiempo óptimos de las distintas técnicas que se utilizaron.

Una vez determinados el tiempo y la concentración óptima de IGF-1, los cultivos fueron preincubados 30 min con inhibidores farmacológicos específicos de los intermediarios de las vías de señalización activadas por IGF-1, antes de aplicar el estímulo: U73122 50 µM para PLC, LY294002 50 µM para PI3K, Ciclosporina A 5 µM para Calcineurina (Biomol Research Lab, Plymouth Meeting, PA); Genisteina 100 µM para proteínas con actividad tirosina-quinasa, Xestospongina C 10 µM para el receptor de IP₃, BimI 10 µM y GO6976 2 µM para PKC y PKC dependientes de calcio respectivamente, KN-93 20 µM para CaMK II, SB203580 20 µM para

p38-MAPK (Calbiochem, La Jolla, CA) y U0126 10 μ M para MEK1/2 (Cell Signaling). Como control del solvente de los fármacos, se utilizó DMSO (Sigma-Aldrich).

Para todos los experimentos, a las células se les cambio nuevamente el medio de diferenciación, previo a los tratamientos, y fueron mantenidas bajo las mismas condiciones donde fueron cultivadas.

6.3 Extracción proteínas totales y Western Blot

Los cultivos se lavaron con 1 ml de PBS 1x y luego se lisaron en 30 μ l de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl a pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 5 mM Na_3VPO_4 , 20 mM NaF y 10 mM pirofosfato de sodio) con un conjunto de inhibidores de proteasas (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA). Las células fueron recolectadas en tubos para microcentrifuga (Eppendorf), incubadas en hielo por 10 min y centrifugadas a 17000 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante recolectado fue guardado a -20°C. Los extractos de proteínas totales se cuantificaron usando “Pierce BCA Protein Assay Kit” bajo las condiciones descritas por el fabricante (Pierce, Rockford, IL).

Se utilizaron 25 μ g de los extractos que fueron mezclados con un buffer de carga denaturante 5x (100 mM Tris-HCl a pH 6.8, 4 % SDS, 0.2 % Azul bromofenol, 20 % Glicerol, 200 mM β -mercaptoetanol) y fueron hervidos durante 3 min. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) al 10% (Laemmli, 1970), electrotransferidos a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA) por 30 min a 400 mA y éstos fueron bloqueados las membranas en BSA al 5% disuelta en TBS-T por 1 hora a temperatura ambiente (Valdés *et al.*, 2012). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpo primario anti-CREB fosforilado (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) en una dilución 1:5000 a 4°C toda la noche. Al día siguiente se lavaron 3 veces por 10 min con TBS-T e incubadas con anticuerpo secundario conjugado a HRP (Cell Signaling) diluido 1:2000 por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas usando ECL según las condiciones del fabricante (Amersham Biosciences, Amersham, UK). Luego a las membranas se les inactivó la HRP mediante una incubación en agua oxigenada al 30 % v/v por 15 min a 37°C. Estas fueron lavadas 3 veces por 10 min con TBS-T, bloqueadas con leche descremada al 5% disuelta en TBS-T e incubadas con el anticuerpo

primario anti-CREB (dilución 1:5000) no fosforilado a 4°C toda la noche. Una vez visualizadas, mediante el mismo protocolo mencionado anteriormente, las membranas nuevamente fueron incubadas en una solución “stripping” (62.5 mM Tris-HCl a pH 6.8, 2 % SDS, y 50 mM β-mercaptoetanol) por 10 min a 50°C. Después se lavaron 3 veces por 10 min con TBS-T, bloqueadas con leche descremada al 5% disuelta en TBS-T e incubadas con el anticuerpo primario anti-β-Actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluido 1:4000 como control de carga a 4°C toda la noche. El tratamiento para visualizar estas membranas fue el mismo que los anteriores. Una vez que los films fueron revelados, se escanearon para analizar las bandas obtenidas por densitometría con el programa de uso gratuito ImageJ. Los resultados se expresaron como la razón de anti-pCREB/CREB.

6.4 Construcción vectores reporteros

El vector reportero de CREB se encontraba disponible en el laboratorio, el cual consta de 3 sitios CRE *en tandém* en el vector pGL3-Basic (Promega, Madison, WI). Por otra parte, se construyó un vector reportero con el promotor de *miostatina* de rata (2001pb). Se extrajo el DNA genómico de los mioblastos usando “ISOLATE Genomic DNA Mini Kit” bajo las condiciones del fabricante (Bioline, USA). Se amplificó la región entre -1875 y +126 del promotor mediante PCR con los partidores sentido 5`-CTCGAGTTTTAAAATCGGCACAATCTCTTT-3` y antisentido 5`-CTCGAGTTTGAAATAAAAGGCTTGAAACAA-3` basados en la secuencia obtenida de la base de datos NCBI (GenBank: NC_005108.2). La región subrayada corresponde a un adaptador con el sitio de restricción XhoI para la digestión (Promega). El proceso del PCR fue de: denaturación inicial a 94°C 2 min; 40 ciclos de denaturación a 94°C 45 seg, alineamiento a 50°C 30 seg y extensión a 72°C 1:30 min; y extensión final a 72°C 10 min. Posteriormente el producto de PCR fue clonado mediante el sistema pGEM-T Easy según el protocolo del fabricante (Promega).

Para realizar la clonación, se prepararon células *Escherichia coli* JM109 quimiocompetentes. Para su preparación, se dejó creciendo un precultivo de 5 ml en medio LB (MO-BIO) estéril agitando en un Shaker (GFL) a 225 RPM a una temperatura de 37°C. Luego se inocularon 100 ml de LB nuevo con el precultivo y nuevamente se dejó en el Shaker hasta alcanzar un OD₆₀₀ cercano a 0,4. Después de incubar en hielo por 10 min, se centrifugó por 10 min a 1500 x g a una temperatura de 4°C. Se resuspendió el pellet en 25 ml de 0.1 M MgCl₂ (frío

y filtrado), se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó por 10 min a 1500 x g a una temperatura de 4°C. En seguida se resuspendió el pellet en 5 ml de 0.1 M CaCl₂ (frío y filtrado), se dejó incubando en hielo por 20 min y se centrifugó por 10 min a 1500 x g a una temperatura de 4°C. Finalmente se resuspendió el pellet en 2 ml en una solución de 85 % 0.1 M CaCl₂ 0.1 M y glicerol 15 % (frío y filtrado) para ser alicuotado en tubos de microcentrifuga con 100 µl que fueron previamente congelados en hielo por 5 min antes de ser almacenados a -80°C. Luego de ser preparadas, se utilizó una alícuota para realizar la transformación bacteriana por shock-térmico. Las bacterias fueron descongeladas en hielo y cuidadosamente se agregó 10 µl del vector ligado con la secuencia de interés, agitando suavemente para mezclar. Esta mezcla fue incubada durante 20 min en hielo para luego aplicar un shock térmico a 42°C durante 42 segundos e inmediatamente volver a incubar en hielo por 2 min. Luego se agregó 1ml de LB a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad y se dejó agitando en Shaker a una temperatura de 37°C durante 1 hora. Finalizado el tiempo, los tubos fueron centrifugados a 800 x g durante 5 min. A continuación el sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de LB estéril. La suspensión se sembró en placas LB agar con ampicilina (100 µg/ml) en las cuales se utilizó como marcador de selección 0.3 mM Xgal y como inductor 0.4 mM IPTG (Biomol). Estas fueron incubadas en una estufa a 37°C por un tiempo aproximado de 16-18 horas (Heraeus). Se seleccionaron colonias blancas con una punta estéril de micropipeta, se sembraron en medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y fueron crecidas en agitación constante a 200 RPM y 37°C durante 16-18 horas aproximadamente. Al día siguiente se tomaron 25 ml para la purificación plasmidial mediante “Plasmid Midi kit” bajo las condiciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA) y guardados a -20°C. Posteriormente los vectores fueron digeridos con XhoI (10 U/µl) (Promega) para observar la liberación del inserto con el protocolo descrito de la enzima de restricción mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% TAE 1x de 30 min a 400 mA. Las muestras de DNA fueron cargadas en un buffer de carga 5x y en paralelo con 5µl de marcador HyperLadder 1 (Bioline). Terminado de correr el gel, fue teñido en Bromuro de Etidio por 15 min y visualizado en un transiluminador (UVP). Al clon con el inserto se le realizó un protocolo de “glicerol stock” para ser almacenado a -80°C. 10 ml del precultivo fresco se centrifugaron a 800 x g por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido suavemente en 1 ml de “storage buffer” (100 mM Tris a pH 7.5, 10 mM MgCl₂ (filtrado, 50 % glicerol).

Una vez obtenido el inserto en el vector de clonamiento, se realizó una digestión a gran escala utilizando 10 µg de vector purificado que se sometió a una electroforesis para poder aislar la banda de interés mediante el sistema “Wizard SV Gel and PCR Clean-up” bajo condiciones del fabricante (Promega). Por otro lado, el vector reportero utilizado para subclonar el inserto fue pGL4.15 (Promega) que fue previamente linearizado con XhoI usando 10 µg de vector y fue sometido a un protocolo de desfosforilación con la fosfatasa SAP (1 U/µl), según las condiciones del fabricante (Promega). Para eliminar componentes que pudieran interferir en el clonamiento, luego de la desfosforilación de los extremos cohesivos del vector este fue purificado de la misma forma que el inserto y luego se procedió a realizar la ligación con la DNA Ligasa T4 (3 U/µl) (Promega). Se realizó una mezcla entre el inserto y el vector en razón 3:1 que fue incubada a 45°C por 5 min y luego incubada en hielo por 5 min para facilitar la ligación. Luego se agregó el buffer de ligación 2x y la enzima, se resuspendió y se dejó incubando a 4°C O.N. para optimizar el rendimiento. Finalmente se realizó la transformación bacteriana con todo el producto de ligación, como se mencionó anteriormente, sembradas en placas LB agar con ampicilina e incubadas en a 37°C entre 16-18 horas. Se seleccionaron las colonias blancas, las cuales fueron purificadas por MIDIPREP y sometidas a digestión por XhoI para liberar el inserto, como se mencionó antes. También se realizó un “glicerol stock” del clon con el inserto, el cual fue corroborado posteriormente por PCR y secuenciación.

6.5 Transfección transiente de vector reportero y RNA interferente pequeño

Las células fueron transfectadas de forma transiente con los vectores reporteros CRE-pGL3, Promomstn-pGL4 y/o con RNA interferentes pequeños (siRNA) CREB-1 y no relacionado (Santa Cruz Biotechnology, CA) usando 1 µl de “Lipofectamine™ 2000” (Invitrogen) en 1 ml de medio DMEM-F12. El ensayo reportero de luciferasa se llevó a cabo en mioblastos transfectados con 0,9 µg del reportero más 0,1 µg del normalizador Renilla phRL-TK (Promega) y/o 0,25 µg de siRNA para CREB y no relacionado (NR). Se mantuvo la mezcla por 6 horas, se cambió el medio por uno libre de suero y se mantuvo hasta el día 4.

6.6 Ensayo reportero de luciferasa

Las células transfectadas, posterior al tratamiento, se incubaron por 9 horas, se lavaron con 1 ml de PBS 1x, lisaron en 200 µl de “Passive Lysis Buffer” (Promega) y finalmente se centrifugaron por 5 min a 2000 x g para recolectar el sobrenadante y guardado a -20°C hasta realizar el análisis. La actividad de la luciferasa se determinó con el sistema “Dual-Luciferase Reporter Assay” (Promega), cuya luz fue detectada en un luminómetro (Berthold F12). Los resultados fueron normalizados por la eficiencia expresada entre la luciferasa firefly y Renilla, y el máximo de respuesta fue determinado por las diferencias obtenidas en las células en el tiempo óptimo (Valdés et al., 2012). Como control, se incluyó la transfección del vector vacío el cual no mostró generar efectos en las células tratadas. La eficiencia de transfección fue de 25 %.

6.7 Extracción RNA total y RT-qPCR

La extracción del RNA total de los cultivos se realizó usando el protocolo convencional con el agente Trizol recomendado por el fabricante (Invitrogen), el cual fue almacenado a -80°C hasta su uso. El RNA fue mezclado en buffer de carga 5x (Azul bromofenol saturado, 500 mM EDTA a pH 8, Formaldehído al 37%, formamida, 100% Glicerol y MOPS 10x) para ser visualizado por electroforesis en gel de agarosa 1.2 % en buffer MOPS 1x por 30 min a 400 mA, teñido 15 min en Bromuro de Etidio para evaluar su integridad y cuantificado en un espectrofotómetro Epoch (Biotek, Winooski, VT). Para la síntesis del cDNA, se tomaron 500 ng de los extractos de RNA total con una razón $A_{260/280}$ que fuera cercana a 1,8. Se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV con partidores azarosos usando el protocolo descrito por el fabricante (Invitrogen) que fue guardado a -20°C.

Para el PCR en tiempo real (qPCR), se utilizaron los siguientes partidores diseñados en el laboratorio mediante el programa de uso gratuito AmplifX: *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapdh)* (GenBank: NM_017008.3) sentido 5`-CCCCCAATGTATCCGTTGTG-3` y antisentido 5`-TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3` (118pb) y *miostatina* (GenBank: NC_019151.1) sentido 5'-GCTCAAACAGCCTGAATCCAAC-3' y antisentido 5'-TCACAGTCAAGCCCAAAGTCTC-3' (174pb). Los experimentos de PCR fueron realizados en un termociclador MX3000p (Stratagene) utilizando un volumen final de 15 µl, los cuales

contenían 7,3 µl de Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix 2x (Stratagene), 1,5 µl de un mix de partidores sentido y antisentido para cada gen (10 µM), 0,2 µl de ROX 1 mM y 6 µl de cDNA en la dilución valorada (1:40), la que fue estimada realizando una curva estándar con diluciones seriadas de un pool de cDNA. Anterior a esta etapa se realizó una curva de disociación con el fin de corroborar la especificidad de los partidores y de descartar la formación de dímeros de estos. Por último se realizó la cuantificación de los niveles de expresión relativa de *miostatina* utilizando como gen normalizador a *gapdh*. Las condiciones de los PCR fueron: denaturación inicial a 95°C 10 min; 40 ciclos de denaturación a 95°C 30 seg, alineamiento a 58°C 30 seg y extensión a 72°C 30 seg. A los resultados obtenidos se les identificó el ciclo umbral (Ct) en base a la misma línea basal fijada manualmente y fueron analizados usando el programa de uso gratuito QGene (Simon, 2003).

6.8 Análisis de resultados

Los experimentos se realizaron 2 o 3 veces por duplicado o triplicado de las muestras para completar un número igual a 6 (n=6). Todos los resultados obtenidos fueron normalizados respecto a la condición control, representado en veces de inducción, y se expresaron como un promedio \pm error estándar de la media (SEM). Para evaluar diferencias entre los grupos clasificados se realizó un análisis de varianza de una vía (one way-ANOVA), seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa computacional GraphPad Prism 5.

VII. RESULTADOS

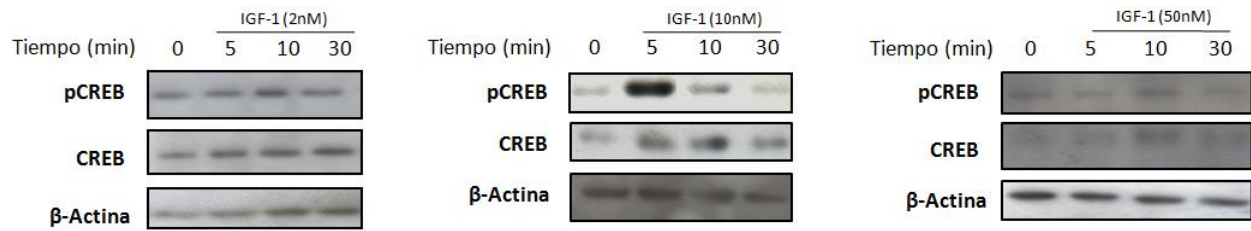
7.1 IGF-1 induce la activación de CREB

Para determinar la activación de CREB por IGF-1, se utilizó la técnica de western blot. Cultivo primario de mioblastos en fase de diferenciación (día 4 post plaqueo) fueron estimulados con IGF-1 recombinante a concentraciones subfisiológicas, fisiológicas y suprafisiológicas, obteniéndose extractos de proteínas totales a los tiempos 0 (control), 5, 10 y 30 minutos post-estímulo. Las proteínas fueron resueltas mediante SDS-PAGE y electrotransferidas a una membrana donde se analizó los niveles de fosforilación de CREB, CREB total y β -Actina mediante inmunoblot. Se observa que a los 5 minutos de tratamiento con IGF-1 fisiológico (10 nM) induce 1,6 veces la fosforilación de CREB respecto al control ($***p < 0.001$) (**Figuras 5 A y B**). No se observan cambios en los niveles de fosforilación a los 10 y 30 minutos post-estímulo, lo que sugiere un efecto transiente de IGF-1 en la fosforilación de CREB. Análisis realizados a concentraciones subfisiológicas (2 nM) y suprafisiológicas (50 nM) de IGF-1 no revelan variaciones en la fosforilación de CREB, sugiriendo un efecto dosis específico de IGF-1. También se puede visualizar que en los tiempos analizados no existen variaciones en los niveles de expresión de la proteína CREB.

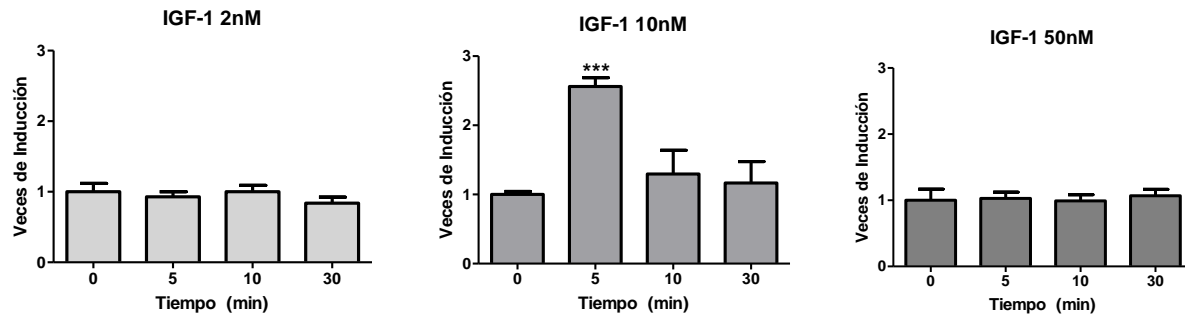
Paralelamente, se evaluó la activación transcripcional dependiente de CREB mediante la técnica de vector reportero. De esta manera, cultivo primario de mioblastos (día 3 post-plaqueo) fueron co-transfectados con un vector reportero para CREB (Firefly luciferasa) y vector normalizador (Renilla Luciferasa). Los mioblastos durante el día 4, fueron estimulados con IGF-1 (fisiológico, suprafisiológico y subfisiológico) y cuantificados los niveles de luminiscencia dual a las 9 horas post-estímulo. Se observa que IGF-1 a concentraciones fisiológicas y suprafisiológicas induce un aumento de 3,5 y 4 veces en los niveles de luminiscencia por sobre el control ($***p < 0.001$), respectivamente, lo que sugiere un efecto dosis dependiente de IGF-1 (**Figura 5 C**). Sin embargo, IGF-1 subfisiológico presenta solo una leve tendencia de aumento en la inducción que no fue estadísticamente significativa.

Por lo tanto, estos resultados en conjunto indican que durante la diferenciación de los mioblastos, IGF-1 induce tanto la fosforilación así como la activación transcripcional dependiente de CREB.

A.



B.



C.

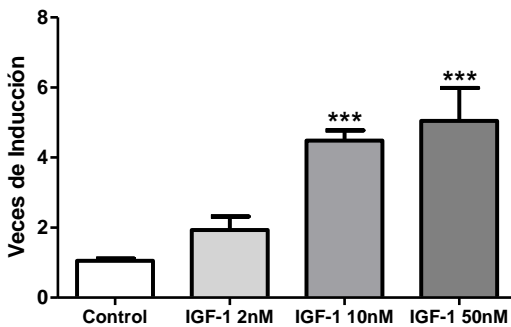


Figura 5: IGF-1 induce la activación de CREB. Cultivo primario de mioblastos en diferenciación fueron estimulados con IGF-1 recombinante a concentraciones subfisiológicas (2nM), fisiológicas (10nM) o suprafisiológicas (50nM). **A.** Western blot utilizando anticuerpos anti-pCREB, anti-CREB y anti- β -Actina como control de carga. Los gels son representativos de 3 experimentos independientes en duplicado. **B.** Resultado del análisis densitométrico de los western blot cada tratamiento, normalizados entre pCREB/CREB. **C.** Resultado del análisis de actividad luciferasa relativa del reportero CREB, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** $p < 0.001$ respecto al control en veces de inducción.

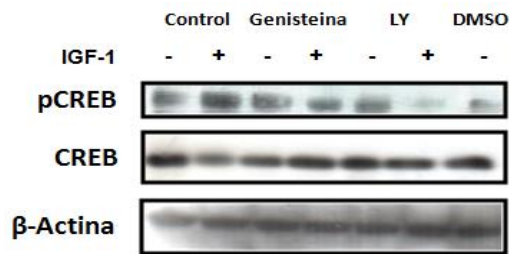
7.2 Distintas vías de señalización participan en la activación de CREB

Para determinar las vías de señalización activadas por IGF-1 que participan en la fosforilación de CREB, cultivo primario de mioblastos fueron preincubados por 30 min con inhibidores farmacológicos específicos y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM) obteniéndose extractos de proteínas totales a los 5 minutos los cuales fueron analizados mediante western blot. Se observa que los tratamientos con Genisteina 100 μ M (inhibidor de proteínas con actividad tirosina-quinasa) y LY294002 50 μ M (inhibidor de PI3K) inhibieron la fosforilación de CREB inducida por IGF-1 ($\#p < 0.05$ y $\###p < 0.001$, respectivamente) (**Figura 6 A y B**). Para evaluar la contribución de MAP kinasas en la activación de CREB inducida por IGF-1, mioblastos fueron preincubados con UO126 10 μ M (inhibidor de MEK1/2) y SB203580 20 μ M (inhibidor de p38-MAPK) observándose una importante disminución de la fosforilación de CREB ($\###p < 0.001$) (**Figura 7 A y B**). Para determinar la contribución de proteínas involucradas en la liberación de calcio desde reservorios intracelulares en la activación de CREB inducida por IGF-1, mioblastos fueron preincubados con U73122 50 μ M (inhibidor de PLC) y Xestospongina C 10 μ M (inhibidor de IP₃R) también se visualiza una inhibición de la fosforilación de CREB ($\#p < 0.01$ y $\###p < 0.001$, respectivamente) (**Figura 8 A y B**). Por último para evaluar la participación de proteínas calcio dependientes en la fosforilación de CREB inducida por IGF-1, mioblastos fueron preincubados en la presencia de BimI 10 μ M (inhibidor de PKC), KN-93 20 μ M (inhibidor de CaMK II), GO6976 2 μ M (inhibidor PKC dependiente de calcio), y Ciclosporina A 5 μ M (inhibidor de Calcineurina), observándose que los tratamientos con BimI, GO6976 y KN-93 disminuyeron sustantivamente la fosforilación de CREB ($\###p < 0.001$) no así con Ciclosporina A que no varía respecto al estímulo con IGF-1 (**Figura 9 A y B**).

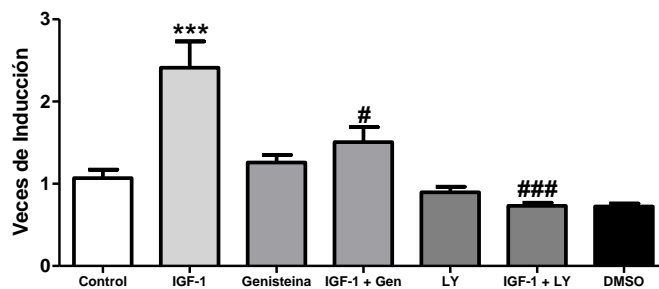
Complementariamente, se realizaron ensayos de vector reportero para analizar la contribución de estas vías de señalización en la transcripción dependiente de CREB. Se observa que la preincubación con Genisteina, LY294002 (**Figura 6 C**), UO126, SB203580 (**Figura 7 C**), U73122, Xestospongina C (**Figura 8 C**), BimI, KN93 y GO6976 (**Figura 9 C**) inhibieron significativamente la actividad reportera inducida por IGF-1, pero no con Ciclosporina A.

En consecuencia, durante la diferenciación de los mioblastos, IGF-1 estimula tanto la fosforilación como la activación transcripcional dependiente de CREB activando diferentes vías de señalización como MEK-ERK 1/2, p38-MAPK, PI3K/PLC/IP₃ y distintas proteínas quinasas dependientes de calcio como PKC y CaMK, pero no vía Calcineurina.

A.



B.



C.

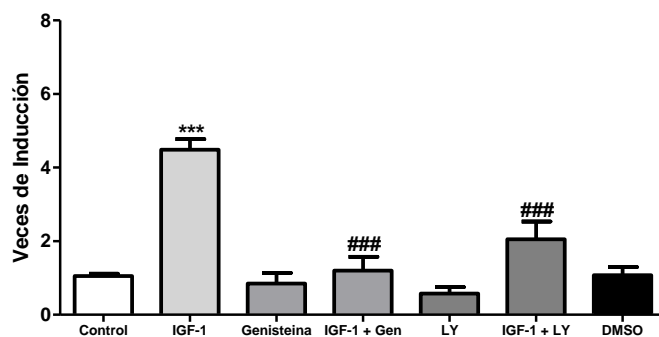
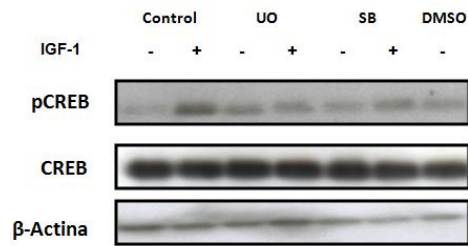
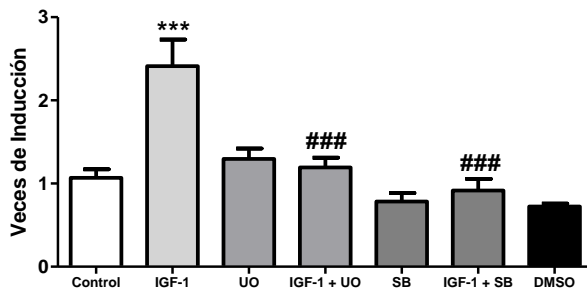


Figura 6: La vía IGF-1R/PI3K participa en la activación de CREB. Cultivo primario de mioblastos en diferenciación fueron preincubados 30 min con Genisteina (100 μ M), LY294002 (50 μ M) o DMSO como control solvente y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM) **A.** Western blot con anticuerpos anti-pCREB, anti-CREB y anti- β -Actina como control de carga. Los geles son representativos de 3 experimentos independientes en duplicado. **B.** Resultado del análisis densitométrico de los western blot cada tratamiento, normalizados entre pCREB/CREB. **C.** Resultado del análisis de actividad luciferasa relativa del reportero CREB, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** $p < 0.001$ respecto al control, # $p < 0.05$ y ### $p < 0.001$ respecto al estímulo (IGF-1) en veces de inducción.

A.



B.



C.

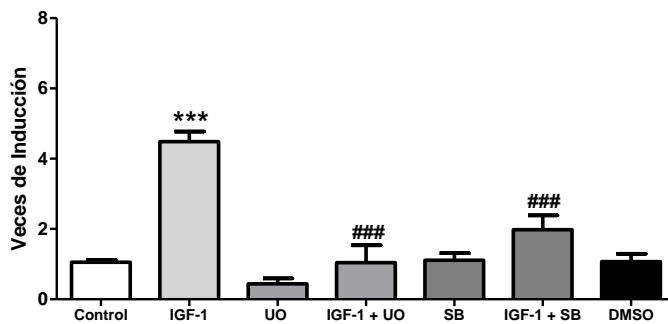
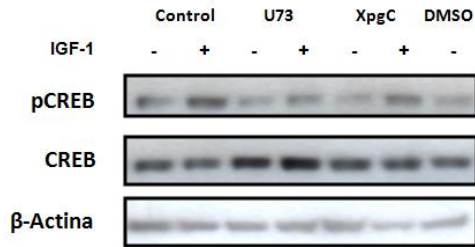
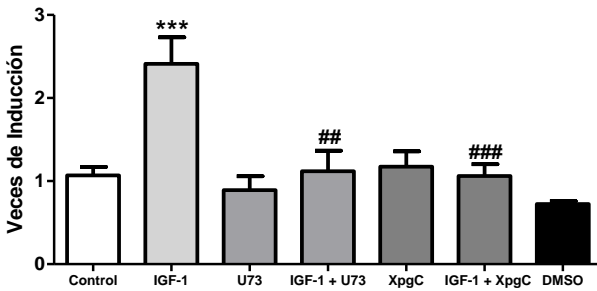


Figura 7: La vías MEK-ERK1/2 y p38-MAPK participan en la activación de CREB. Cultivo primario de mioblastos en diferenciación fueron preincubados 30 min con UO126 (10 μ M), SB203580 (20 μ M) o DMSO como control solvente y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM). **A.** Western blot con anticuerpos anti-pCREB, anti-CREB y anti- β -Actina como control de carga. Los geles son representativos de 3 experimentos independientes en duplicado. **B.** Resultado del análisis densitométrico de los western blot cada tratamiento, normalizados entre pCREB/CREB. **C.** Resultado del análisis de actividad luciferasa relativa del reportero CREB, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** $p < 0.001$ respecto al control y ### $p < 0.001$ respecto al estímulo (IGF-1) en veces de inducción.

A.



B.



C.

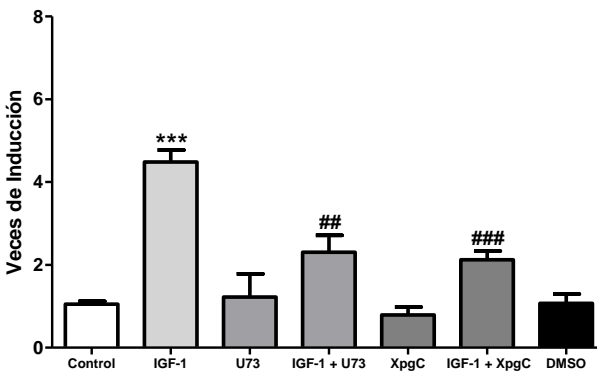
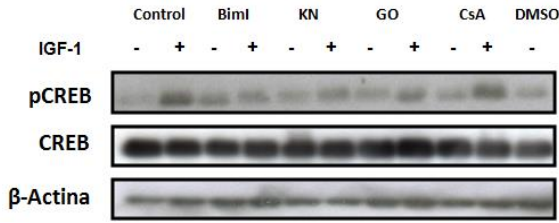
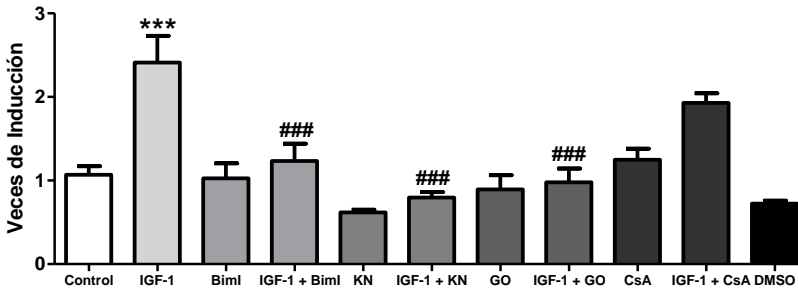


Figura 8: La vía PLC/IP₃ participa en la activación de CREB. Cultivo primario de mioblastos en diferenciación fueron preincubados 30 min con U73122 (50 μ M), Xestospongina (10 μ M) o DMSO como control solvente y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM). **A.** Western blot con anticuerpos anti-pCREB, anti-CREB y anti- β -Actina como control de carga. Los geles son representativos de 3 experimentos independientes en duplicado. **B.** Resultado del análisis densitométrico de los western blot cada tratamiento, normalizados entre pCREB/CREB. **C.** Resultado del análisis de actividad luciferasa relativa del reportero CREB, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** $p < 0.001$ respecto al control, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ respecto al estímulo (IGF-1) en veces de inducción.

A.



B.



C.

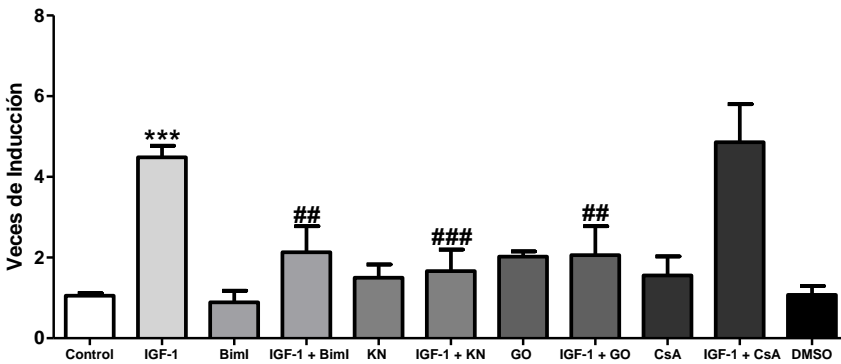


Figura 9: Las proteínas quinasas dependientes de calcio PKC y CaMK participan en la activación de CREB.

Cultivo primario de mioblastos en diferenciación fueron preincubados 30 min con BimI (10 μ M), KN-93 (20 μ M), GO6976 (2 μ M), Ciclosporina A (5 μ M) o DMSO como control solvente y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM). **A.** Western blot con anticuerpos anti-pCREB, anti-CREB y anti- β -Actina como control de carga. Los geles son representativos de 3 experimentos independientes en duplicado. **B.** Resultado del análisis densitométrico de los western blot cada tratamiento, normalizados entre pCREB/CREB. **C.** Resultado del análisis de actividad luciferasa relativa del reportero CREB, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** p < 0.001 respecto al control, ## p < 0.01 y ### p < 0.001 respecto al estímulo (IGF-1) en veces de inducción.

7.3 Construcción de vector reportero para el promotor de miostatina

Con el objetivo de monitorear la actividad promotora del gen de *miostatina*, se construyó un vector reportero que contiene el promotor murino para *miostatina* que comanda la expresión de firefly luciferasa. Utilizando DNA genómico de rata como templado se amplificó mediante PCR un fragmento de 2001 pb comprendido entre -1875 y +126 respecto al sitio de inicio de la transcripción para *miostatina* (**Figura 10 A**). El fragmento obtenido fue resuelto en gel de agarosa, purificado y clonado utilizando el sistema pGEM-T Easy (**Figura 10 B**).

Este fragmento de *miostatina* fue liberado mediante digestión con la enzima XhoI, sitios incorporados en los partidores utilizados para la amplificación, y subclonado en el vector pGL4.15 el cual contiene un sitio de múltiple clonamiento acoplado al gen reportero de luciferasa (*luc2P*) con una señal poli A, un origen de replicación y genes que confieren resistencia a la Ampicilina e Higromicina para el crecimiento selectivo en el medio de cultivo (**Figura 10 C**).

Finalmente, se confirmó la identidad y orientación deseada del inserto mediante secuenciación y PCR.

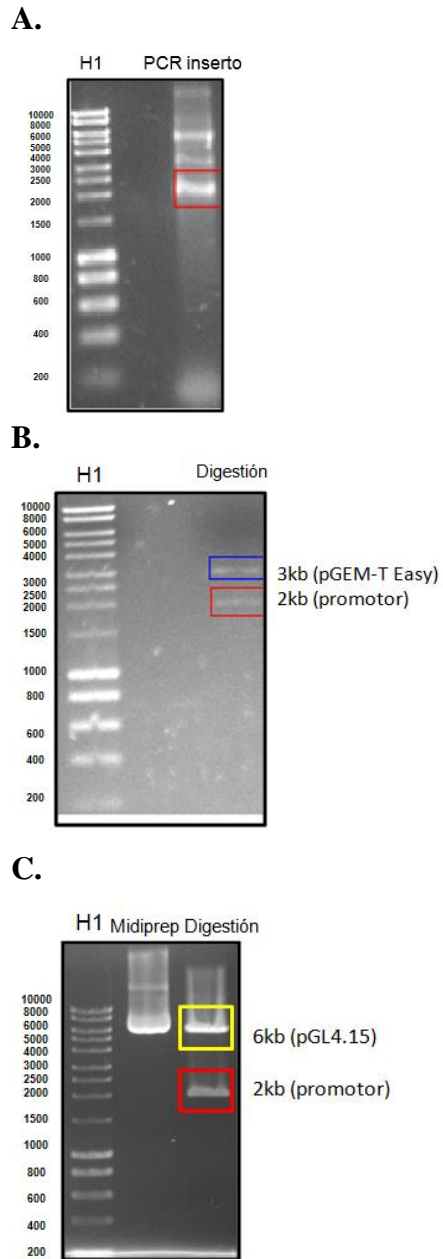


Figura 10: Clonamiento del promotor para *miostatina* de rata. A. Amplificación y clonamiento del promotor en vector pGEM-t Easy. Amplificación del fragmento de 2kb del promotor de *miostatina* por PCR (marcado en rojo). **B. Clonamiento del promotor de *miostatina* en vector pGEM-t Easy.** Digestión del vector clonado (marcado en azul) con enzima XhoI para liberar el inserto (marcado en rojo). **C. Subclonamiento del promotor de *miostatina* en vector reportero pGL4.15.** El primer carril corresponde al vector reportero pGL4.15 el cual fue linearizado con XhoI, desfosforilado y purificado. El segundo carril corresponde al inserto de 2kb liberado del vector pGEM-T Easy que posteriormente fue purificado. En el otro gel se muestra una digestión del vector clonado con enzima XhoI para liberar el inserto (marcado en rojo). Las muestras fueron cargadas con buffer de carga 5x, corridas en electroforesis en geles de agarosa 1% en TAE 1X por 30 min a 400 mA y los geles fueron teñidos en Bromuro de Etidio por 15 min. H1 corresponde a una carga de 5 μ l del marcador de peso molecular HyperLadder 1.

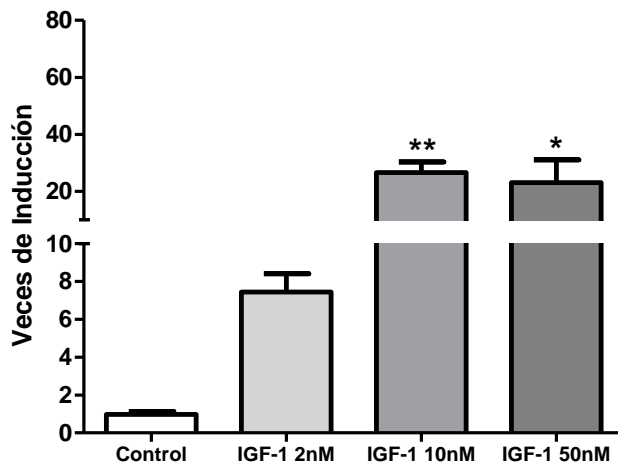
7.4 IGF-1 induce la expresión génica de miostatina

Con objeto de evaluar la actividad promotora de *miostatina* inducida por IGF-1 se utilizó la técnica de vector reportero. Para ello, los cultivos de mioblastos (día 3 post-plaqueo) fueron co-transfectados con un vector reportero para el promotor de *miostatina* (Firefly luciferasa) y un vector normalizador (Renilla Luciferasa). Los mioblastos durante el día 4, fueron estimulados con IGF-1 recombinante a diferentes concentraciones (subfisiológicas, fisiológicas y suprafisiológicas) y cuantificados los niveles de luminiscencia dual 9 horas post-estimulo. Se observa que los tratamientos con IGF-1 a concentraciones fisiológicas (10 nM) y suprafisiológicas (50 nM) inducen un incremento significativo en los niveles de luminiscencia, llegando a ser 25,6 y 22 veces respecto al control (** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$), respectivamente, sugiriendo un efecto dependiente de la dosis de IGF-1 (**Figura 11 A**). No obstante, el tratamiento con IGF-1 subfisiológico (2 nM) solo marca una tendencia al aumento de la luminiscencia (6,4 veces respecto al control) que no resultó ser estadísticamente significativo.

Adicionalmente, se analizó la expresión del mRNA de *miostatina* mediante la técnica de RT-qPCR. Cultivo primario de mioblastos en fase de diferenciación (día 4 post-plaqueo) fueron estimulados con IGF-1 (fisiológicas, subfisiológico y suprafisiológico), obteniéndose extractos de RNA totales a los tiempos 0 (sin tratamiento), 2, 4 y 6 horas post-estimulo. Adicionalmente se realizó un control solvente en células estimuladas con PBS (control). Luego de la cuantificación y análisis de integridad del RNA, se realizó la síntesis de ADN complementario (cDNA) utilizando partidores azarosos. Finalmente los cDNAs obtenidos fueron diluidos para realizar un PCR en tiempo real y analizar los valores de Ct obtenidos del gen blanco (*miostatina*) y el gen de referencia (*gapdh*). Se visualiza que IGF-1 fisiológico induce significativamente la expresión génica de *miostatina* mostrando un incremento de 2,9 veces respecto al control a las 4 horas (** $p < 0.001$) y luego disminuye levemente a las 6 horas, siendo 1,7 veces del control (** $p < 0.01$), observándose un efecto transiente (**Figura 11 B**). IGF-1 suprafisiológico muestra una tendencia a incrementar la expresión, siendo significativa a las 6 horas por 1,3 veces del control (* $p < 0.05$), pero no fue mayor que IGF-1 fisiológico a las 6 horas. Además, durante los tiempos tratados, IGF-1 subfisiológico no induce la expresión de *miostatina*, manteniéndose estable y cercano al control.

Por lo tanto, durante la diferenciación de los mioblastos, IGF-1 induce tanto la activación transcripcional del promotor como la expresión del mensajero de *miostatina*.

A.



B.

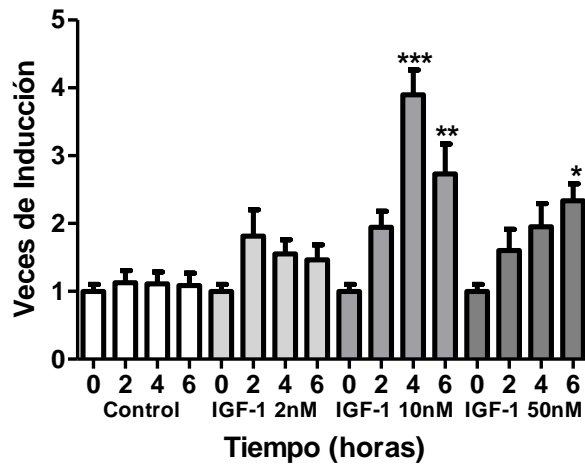


Figura 11: IGF-1 induce la expresión génica de *miostatina*. Los cultivos de mioblastos en diferenciación fueron estimulados con IGF-1 recombinante a concentraciones subfisiológicas (2nM), fisiológicas (10nM) o suprafisiológicas (50nM) **A.** Resultados de los análisis de actividad luciferasa relativa del reportero Promomstn, normalizado entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. **B.** Resultado de los análisis de expresión relativa del mensajero de *miostatina* (*mstn*) por PCR en tiempo real, normalizados respecto a *gapdh*. Se realizaron 3 experimentos independientes en duplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ respecto al control en veces de inducción.

7.5 Distintas vías de señalización, activadas por IGF-1, estimulan la expresión génica de miostatina

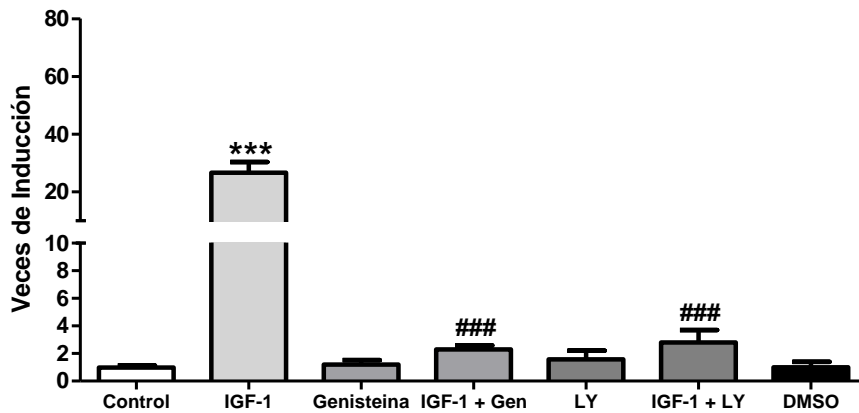
Para definir las vías de señalización activadas por IGF-1 que participan en la actividad promotora de *miostatina*, los cultivos de mioblastos fueron preincubados 30 min con distintos inhibidores farmacológicos específicos y posteriormente estimulados con IGF-1 a concentraciones fisiológicas por 9 horas para los ensayos de vector reportero. Se observa que los tratamientos con Genisteina 100 μM (inhibidor de proteínas con actividad tirosina-quinasa) y LY294002 50 μM (inhibidor de PI3K) disminuyen significativamente los niveles de luminiscencia respecto al estímulo (### $p < 0.001$), llegando a los niveles basales (**Figura 12 A**). Posteriormente se evaluó la contribución de las MAPKs utilizando los inhibidores UO126 10 μM (inhibidor de MEK1/2) y SB203580 20 μM (inhibidor de p38-MAPK) donde también se observa una inhibición de la luminiscencia de manera significativa (### $p < 0.001$) (**Figura 13 A**). Luego se analizó la contribución de proteínas que permiten la liberación de calcio intracelular mediante tratamientos con los inhibidores U73122 50 μM (inhibidor de PLC) y Xestospongina C 10 μM (inhibidor de IP₃R) donde igualmente disminuyeron considerablemente la luminiscencia respecto al estímulo con IGF-1 (### $p < 0.001$) (**Figura 14 A**). Finalmente, se evaluaron distintas proteínas dependientes de calcio mediante el uso de los inhibidores farmacológicos GO6976 2 μM (inhibidor de PKC dependiente de calcio) y KN-93 20 μM (inhibidor de CaMK II) que muestran una disminución importante en los niveles de luminiscencia (### $p < 0.001$ y ## $p < 0.01$, respectivamente) (**Figura 15 A**). Sin embargo, los tratamientos con Ciclosporina A 5 μM (inhibidor de Calcineurina) y BimI 10 μM (inhibidor de PKC) se visualiza que la activación transcripcional del promotor fue similar a la del estímulo con IGF-1 a concentraciones fisiológicas. Además, en los cultivos tratados con los inhibidores BimI y KN-93 en ausencia del estímulo de IGF-1 se registra una tendencia a incrementar la activación transcripcional del promotor de *miostatina* que no fue significativa.

De manera complementaria se analizó la contribución de estas vías de señalización en la expresión del mRNA de *miostatina*. Los mioblastos fueron preincubados por 30 min con inhibidores farmacológicos específicos y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM) obteniéndose extractos de RNA totales a las 4 horas, los cuales fueron utilizados para sintetizar cDNA y analizados mediante PCR en tiempo real. Se observa que la preincubación con Genisteina, LY294002 (**Figura 12 C**), UO126, SB203580 (**Figura 13 C**), U73122,

Xestospongina C (**Figura 14 C**), KN93 y GO6976 (**Figura 15 C**) inhibieron significativamente la expresión de *miostatina* inducida por IGF-1. Por el contrario, los tratamientos con BimI y Ciclosporina A muestran que los niveles de expresión son similares al estímulo con IGF-1.

Por consiguiente, durante la diferenciación de los mioblastos, IGF-1 estimula tanto la activación transcripcional como la expresión del mensajero de *miostatina* activando diferentes vías de señalización como MEK-ERK 1/2, p38-MAPK, PI3K/PLC/IP₃ y diferentes proteínas quinasas dependientes de calcio como PKC y CaMK, pero no vía Calcineurina.

A.



B.

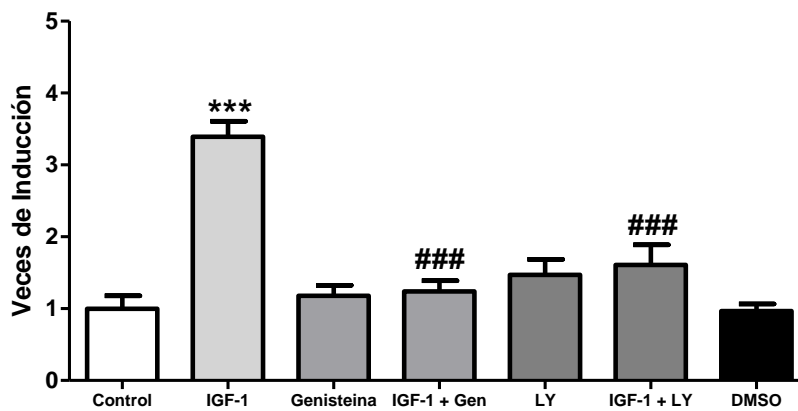
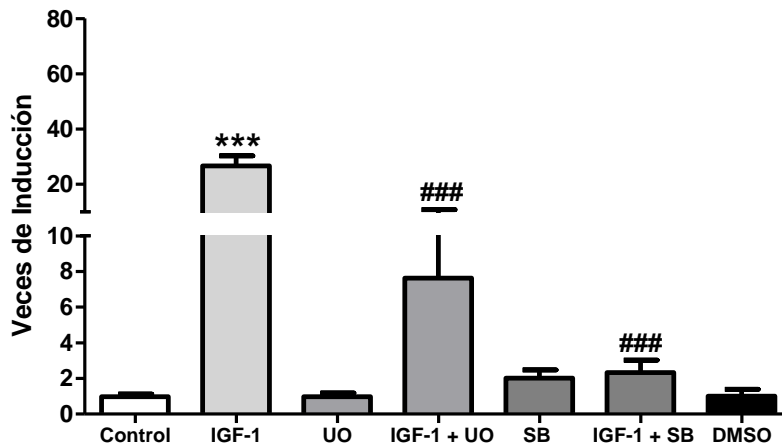


Figura 12: La vía de IGF-1R/PI3K, activada por IGF-1, estimula la expresión génica de *miostatina*. Los cultivos de mioblastos en diferenciación fueron preincubados 30 min con Genisteina (100 μ M), LY294002 (50 μ M) o DMSO como control solvente y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM). **A.** Resultado de los análisis de actividad luciferasa relativa del reportero Promomstn, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. **B.** Resultado de los análisis de expresión relativa del mensajero de *miostatina* (*mstn*) por PCR en tiempo real, normalizados respecto a *gapdh*. Se realizaron 3 experimentos independientes en duplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** $p < 0.001$ respecto al control y ### $p < 0.001$ respecto al estímulo (IGF-1) en veces de inducción.

A.



B.

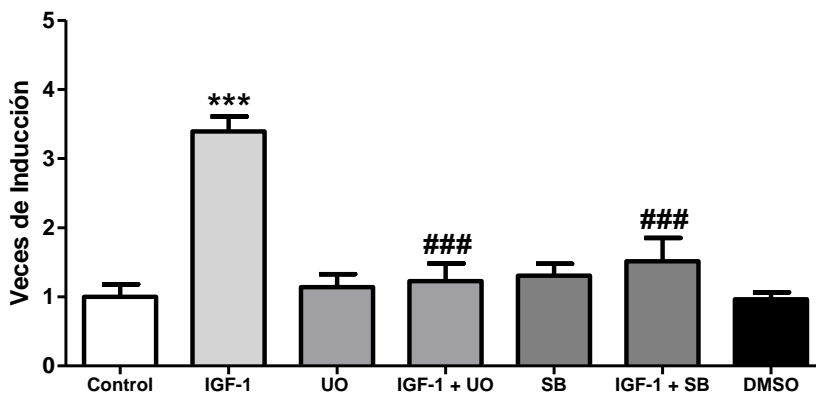
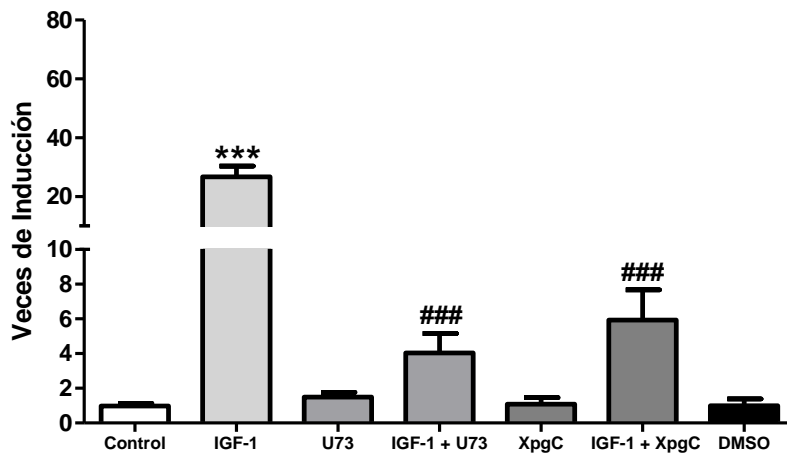


Figura 13: La vías de MEK-ERK1/2 y p38-MAPK, activadas por IGF-1, estimulan la expresión génica de *miostatina*. Los cultivos de mioblastos en diferenciación fueron preincubados 30 min con UO126 (10 μ M), SB203580 (20 μ M) o DMSO como control solvente y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM). **A.** Resultado de los análisis de actividad luciferasa relativa del reportero Promomstn, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. **B.** Resultado de los análisis de expresión relativa del mensajero de *miostatina* (*mstn*) por PCR en tiempo real, normalizados respecto a *gapdh*. Se realizaron 3 experimentos independientes en duplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** $p < 0.001$ respecto al control y ### $p < 0.001$ respecto al estímulo (IGF-1) en veces de inducción.

A.



B.

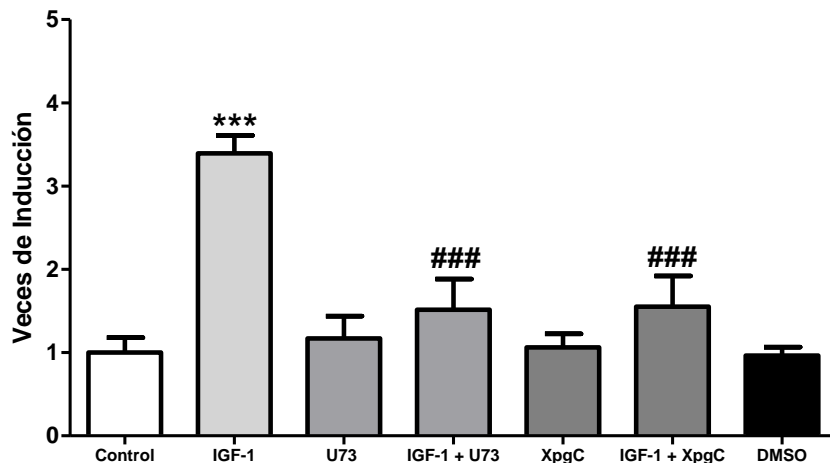
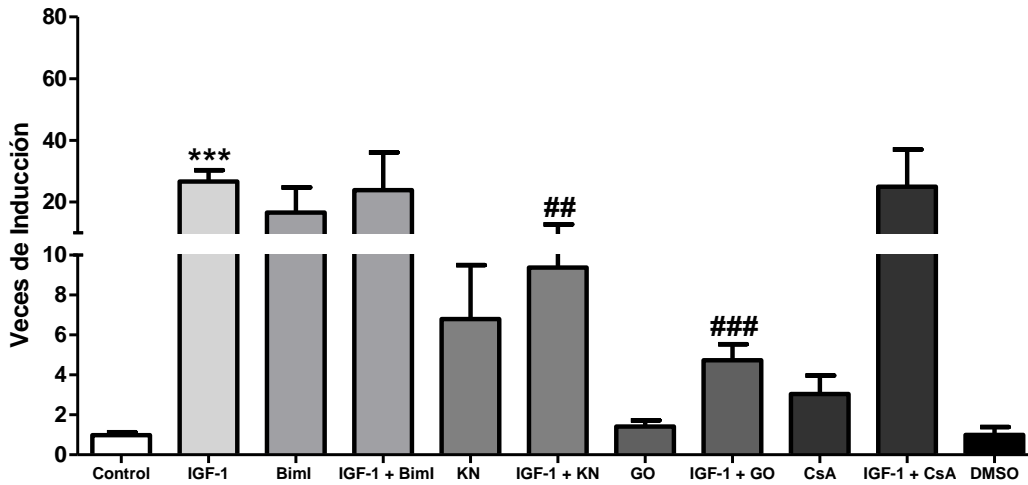


Figura 14: La vía de PLC/IP₃, activada por IGF-1, estimula la expresión génica de *miostatina*. Los cultivos de mioblastos en diferenciación fueron preincubados 30 min con U73122 (50 μ M), Xestospongina (10 μ M) o DMSO como control solvente y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM) **A.** Resultado de los análisis de actividad luciferasa relativa del reportero Promomstn, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. **B.** Resultado de los análisis de expresión relativa del mensajero de *miostatina* (*mstn*) por PCR en tiempo real, normalizados respecto a *gapdh*. Se realizaron 3 experimentos independientes en duplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** $p < 0.001$ respecto al control y ### $p < 0.001$ respecto al estímulo (IGF-1) en veces de inducción.

A.



B.

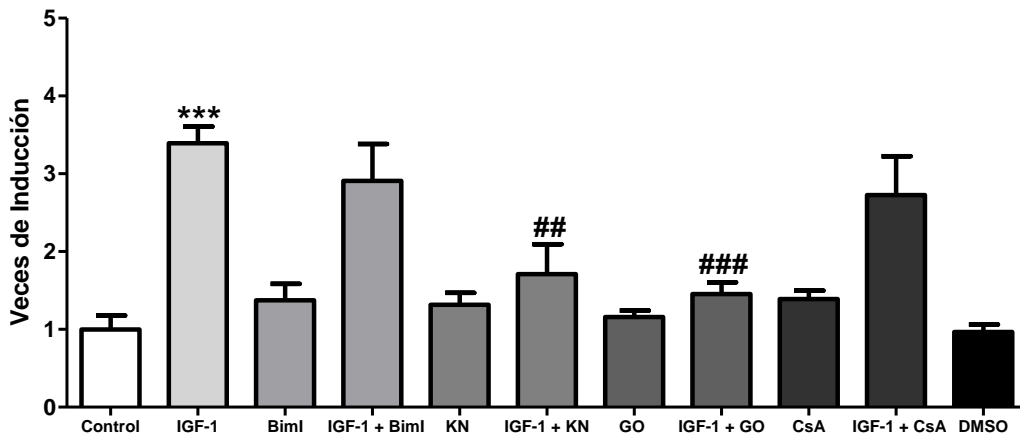
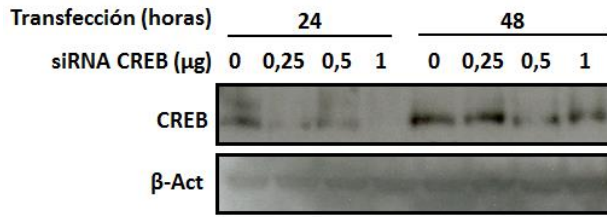


Figura 15: Las proteínas quinasas dependientes de calcio PKC y CaMK, activadas por IGF-1, estimulan la expresión génica de *miostatina*. Los cultivos de mioblastos en diferenciación fueron preincubados 30 min con Biml (10 μ M), KN-93 (20 μ M), GO6976 (2 μ M), Ciclosporina A (5 μ M) o DMSO como control solvente y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM) **A.** Resultado de los análisis de actividad luciferasa relativa del reportero Promomstn, normalizados entre luciferasa/renilla. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. **B.** Resultado de los análisis de expresión relativa del mensajero de *miostatina* (*mstn*) por PCR en tiempo real, normalizados respecto a *gapdh*. Se realizaron 3 experimentos independientes en duplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** p < 0.001 respecto al control; ## p < 0.01 y ### p < 0.001 respecto al estímulo (IGF-1) en veces de inducción.

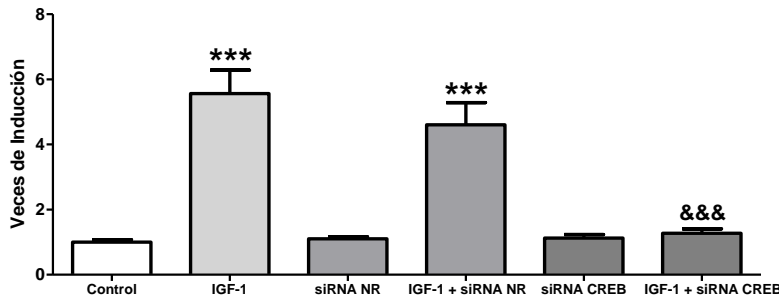
Por último, con el objetivo de determinar si el factor de transcripción CREB regula la expresión génica de *miostatina*, los mioblastos en fase de diferenciación fueron transfectados de forma transiente con RNA interferente pequeño (siRNA) de CREB. Para ello, se evaluó la cantidad de siRNA (0, 0,25, 0,5 y 1 μg) y el tiempo de transfección (24 y 48 horas) en los mioblastos para su posterior tratamiento. Posteriormente se realizaron extractos de proteínas totales, utilizando 12,5 μg para ser analizadas por Western blot con anticuerpos monoclonales anti-CREB y anti- β -Actina como control de carga (**Figura 16 A**). Los resultados indican que la transfección con 0,25 μg de siRNA por 24 horas es suficiente para generar una inactivación en el factor de transcripción CREB, utilizando estas observaciones para los tratamientos con siRNA. Usando la metodología anterior, los mioblastos transfectados con siRNA fueron estimulados con IGF-1 (10 nM) por 4 horas para cuantificar los niveles del mRNA de *miostatina* mediante RT-qPCR (**Figura 16 C**) y co-transfectados con vector reportero por 9 horas para medir mediante la activación transcripcional de la región promotora mediante ensayo luciferasa (**Figura 16 B**). Como se muestra en la figura, los niveles del transcrito disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) respecto al estímulo de IGF-1 con siRNA no relacionado (IGF-1 + siRNA NR), mientras que la actividad promotora se ve disminuida hasta los niveles basales ($p < 0.001$). Los tratamientos con siRNA no relacionado (NR), de CREB o el control solvente (CM) en ausencia del estímulo no afectaron la expresión génica de *misotatina*.

Tomando estos resultados se puede decir que, durante la diferenciación de los mioblastos, el factor de transcripción CREB es activado por IGF-1 para estimular tanto la expresión del mensajero como la activación transcripcional del promotor de *miostatina*.

A.



B.



C.

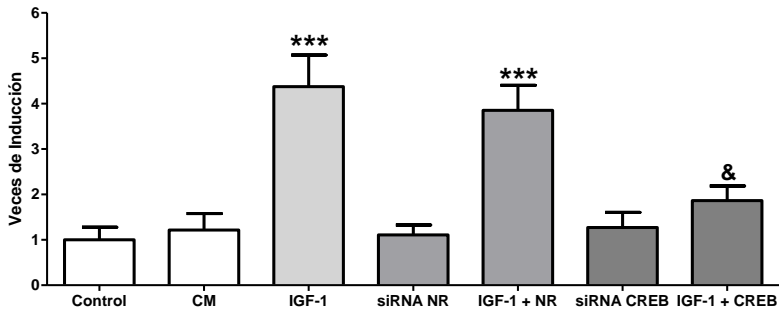


Figura 16: El factor de transcripción CREB regula la expresión génica de *miostatina*. **A.** Análisis de Western blot en mioblastos transfectados con diferentes cantidades de siRNA CREB (0, 0,25, 0,5 1 µg) por 24 y 48 horas utilizando anticuerpos monoclonales anti-pCREB, anti-CREB y anti-β-Actina como control de carga. Los cultivos de mioblastos en diferenciación fueron transfectados con 0,25 µg de siRNA CREB, siRNA no relacionado (NR) y/o co-transfectados con 0,9 µg de vector reportero pGL4.15/PM y 0,1 µg de vector normalizador RL-TK por 24 horas y posteriormente estimulados con IGF-1 (10 nM). **B.** Resultado de los análisis de actividad luciferasa relativa del reportero Promomstn, normalizados entre luciferasa/renilla. **C.** Resultado de los análisis de expresión relativa del mensajero de *miostatina* (*mstn*) por PCR en tiempo real, normalizados con *gapdh*. CM corresponden a células tratados con PBS como control solvente. Se realizaron 2 experimentos independientes en triplicado. Los gráficos se muestran como el promedio ± SEM (n=6), con un análisis estadístico ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey siendo *** $p < 0.001$ respecto al control; & $p < 0.05$ y && $p < 0.001$ respecto al estímulo con IGF-1 más siRNA no relacionado (IGF-1 + siRNA NR) en veces de inducción.

VII. DISCUSIÓN

La diferenciación de los mioblastos es un proceso complejo el cual es regulado de forma coordinada por un balance entre señales positivas y negativas de crecimiento. Dentro de estas señales, se ha descrito que dos proteínas, IGF-1 y Miostatina juegan un papel fundamental. Si bien se han realizado variados estudios para entender los mecanismos mediante los cuales IGF-1 y Miostatina regulan positivamente y negativamente el desarrollo muscular, aún existen incógnitas de cómo las vías de señalización gatilladas por ambos factores de crecimiento interaccionan. En el presente trabajo, se logró dilucidar que IGF-1 induce tanto la fosforilación como la activación transcripcional dependiente de CREB, que ésta activación es mediada por distintas vías de señalización y que son capaces de regular la expresión génica de *miostatina*.

En una primera aproximación se evaluó el efecto de diversas concentraciones de IGF-1 en la activación de CREB, encontrándose que IGF-1 a concentraciones circulantes en la sangre (fisiológicas) induce tanto la fosforilación de forma transiente como la activación transcripcional dependiente de CREB, IGF-1 suprafisiológico únicamente genera un aumento en los niveles de luminiscencia del reportero e IGF-1 a concentraciones subfisiológicas no estimula la activación de CREB. Estos resultados concuerdan parcialmente con lo reportado en literatura en otros modelos de trabajo: En cultivo C2C12 se observó que IGF-1 subfisiológico era capaz de estimular la fosforilación de CREB con efecto dependiente al tiempo (Zheng *et al.*, 2004). En células adenohipofisarias se encontró que IGF-1 suprafisiológico promueve tanto la fosforilación como la activación transcripcional dependiente de CREB (Fernández *et al.*, 2005). En células de la médula adrenal se obtuvo que IGF-1 induce la fosforilación de CREB de forma dependiente de la dosis y al tiempo de tratamiento (Zheng y Quirion, 2006). Además, un estudio realizado en cultivo primario de cardiomiocitos mediante fraccionamiento subcelular y western blot se evidenció que IGF-1 fisiológico induce de forma transiente la fosforilación de CREB, resultados que concuerdan con las observaciones obtenidas (Maldonado *et al.*, 2005).

Tomando en cuenta estos antecedentes, se infiere que las diferencias se presentan en la lejanía de los modelos, donde la sensibilidad de los receptores de IGF-1 varía según el tipo celular. Otra explicación posible, a nivel biológico, es que la fosforilación del residuo de serina-133 en el dominio KID del factor de transcripción CREB no es suficiente para su completa activación (Altarejos y Montminy, 2011; Brodie *et al.*, 2004; Mayr *et al.*, 2001). Una vez que

CREB es fosforilado en el núcleo se une a las secuencias CRE de los promotores, pero se sostiene que esa interacción se encuentra regulada por co-activadores como CBP/p300 o CRTC, los cuales promueven o reprimen dicha unión (Altarejos y Montminy, 2011; Mayr *et al.*, 2001). Se ha observado en ratones transgénicos que sobre expresan la proteína CREB muestran una inhibición en la transcripción dependiente de CREB. Ellos concluyen que un elevado nivel de proteína CREB activa circulando en el núcleo sería rápidamente secuestrada por CBP, impidiendo su interacción con los sitios CRE y llevada a degradación (Brodie *et al.*, 2004). Para que la célula inicie la transcripción, requiere de la participación de las CBP/p300 o CRTC que se acoplarán a la proteína CREB fosforilada, uniéndose a la secuencia CRE y con ello favorece su completa activación.

En la miogénesis, IGF-1 estimula tanto la proliferación como la diferenciación de las células musculares. Para ello, IGF-1 debe unirse con su receptor (IGF-1R) y activar una cascada de señales mediante IRS. Una de ellas, las más estudiada, es la activación de la proteína PI3K que a partir de PIP₂ genera PIP₃, formando sitio de anclaje con Akt para que sea activada y pueda fosforilar factores de transcripción tales como CREB. En este trabajo, los mioblastos fueron preincubados con inhibidores farmacológicos para proteínas con actividad tirosina-quinasa y PI3K, y posteriormente estimulados con IGF-1 fisiológico donde se observó una inhibición en la fosforilación y en la actividad transcripcional dependiente de CREB. Estos resultados indican que la vía IGF-1R/PI3K estimula la activación de CREB, observaciones que son similares a los antecedentes: En células PC12 preincubadas con los inhibidores farmacológicos para proteínas con actividad tirosina-quinasa Herbimicina A y para la PI3K Wortmanina y LY294002, que posteriormente estimuladas con IGF-1 fisiológico, evidenciaron que la fosforilación de CREB fue reducida solo con Herbimicina (Zheng y Quirion, 2006). Por el contrario, estudios en cultivos de cardiomiocitos se realizó un análisis similar con inhibidores de PI3K y observaron una disminución significativa en la fosforilación de CREB (Maldonado *et al.*, 2005; Mehrhof *et al.*, 2001).

Es importante mencionar que IGF-1 no es el único capaz de interactuar con su receptor para estimular el proceso miogénico, sino que además IGF-2 e insulina son afines al receptor IGF-1R y que pueden regular las etapas de la miogénesis (Clemmons, 2009; Kaliman *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005). Se ha estudiado en mioblastos C2C12 tratados con insulina (50 nM) por 3 días que genera un incremento en la formación de miotubos multinucleados, induce la actividad

creatina-quinasa, inhibe al antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y activa al inhibidor del ciclo celular p21. Además, insulina promueve las vías de señalización PI3K, MEK-ERK1/2 y p38-MAPK (Conejo *et al.*, 2001). En células pituitarias estimuladas con insulina (1 μ M) por 5 min activan la cascada de señalización PI3K que conlleva a la fosforilación de CREB, resultados que concuerdan a los obtenidos (Hayakawa *et al.*, 2002). Por otro lado, mioblastos L6E9 estimulados con IGF-2 (40 nM) por 4 días promueven la diferenciación miogénica activando la vía de señalización PI3K (Kaliman *et al.*, 1999). En células del ovario de gallo doméstico se ha demostrado que IGF-2 induce la fosforilación de CREB dependiente de la dosis, pero que no se ve afectada al bloquear tirosina-quinasas (Sirotkin y Grossmann, 2003). En conjunto, los ensayos realizados en este trabajo no permiten discriminar si la activación de las vías de señalización es exclusivamente del receptor de IGF-1, ya que pueden estar participando los receptores de IGF-2 y de insulina que también son blancos de IGF-1 (Denley *et al.*, 2005).

Otra vía de señalización activada por IGF-1, es la de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK). Dentro de las MAPKs, se destaca la participación de las vías ERK1/2 y p38-MAPK en la regulación de las distintas etapas del proceso miogénico. Los ensayos realizados en cultivos preincubados con inhibidores para éstas vías y luego estimuladas con IGF-1 fisiológico, indicaron que las MAPKs estimulan de igual forma la activación de CREB, lo cual concuerda con la bibliografía. Por un lado, se ha descrito que la vía MEK-ERK1/2 promueve principalmente la proliferación celular, sin embargo se ha observado que además participan en otras etapas de la miogénesis como en la diferenciación terminal, en la migración de los mioblastos y en la activación del factor de transcripción miogénico Myf5 de las miofibras (Leloup *et al.*, 2007; Li y Johnson, 2006; Perez-Ruiz *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha descrito que p38-MAPK (isoformas α y β) participa en la diferenciación de células musculares esqueléticas activando a factores transcripcionales como MEF2 y MyoD (Zetsler *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). Además, estudios realizados en células cardíacas, adenohipofisarias y de médula adrenal preincubadas con el inhibidor farmacológico para MEK1 (PD98059) y p38-MAPK (SB203580) que posteriormente fueron tratadas con IGF-1 obtuvieron los mismos resultados, no obstante en éste trabajo se utilizó UO126, inhibidor que bloquea tanto a la isoforma MEK1 como a MEK2 (Fernandez *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005; Mehrhof *et al.*, 2001; Zheng y Quirion, 2006).

Como se mencionó previamente, proteínas como insulina e IGF-2 pueden unirse a receptores de IGF-1 para activar éstas vías de señalización: Estudios en adipocitos marrones

durante su diferenciación estimulados con insulina e inhibiendo la vía MEK-ERK1/2, disminuye tanto la fosforilación como la actividad transcripcional dependiente de CREB (Cypess *et al.*, 2011; Klemm *et al.*, 2001). En cultivo primario de músculo esquelético de rata preincubado con un inhibidor farmacológico para p38-MAPK y luego tratado con insulina por 3.5 min, mostró una disminución en la fosforilación de CREB (Somwar *et al.*, 2000). Por otra parte, en células de ovario de gallo preincubadas con el inhibidor PD98059 y luego estimuladas de IGF-2 disminuyen la fosforilación de CREB (Sirotkin y Grossmann, 2003). Además, en células pulmonares cancerígenas de humano se demostró que IGF-2 estimula la proliferación y supervivencia celular induciendo la fosforilación de CREB mediante la vía MEK-ERK1/2 (Linerth *et al.*, 2005). También, un estudio realizado en epitelio pulmonar de ratón que sobre expresa IGF-2 se induce tumorigénesis permitiendo la proliferación celular mediante la fosforilación de CREB vía MEK-ERK1/2 y p38-MAPK (Moorehead *et al.*, 2003).

Recientemente se ha estudiado otra vía de señalización activada por IGF-1 que involucra la liberación de calcio mediante la fosfolipasa C gamma (PLC γ), principalmente vía PI3K, generando IP₃ para unirse a su receptor (IP₃R) en el retículo sarcoplásmico y con ello liberar el calcio al espacio intracelular (Maffuci y Falasca, 2007; Valdés *et al.*, 2012). Como se describió anteriormente, los datos obtenidos por el grupo de laboratorio demostraron que IGF-1 induce la liberación de calcio mediante la vía PI3K/PLC γ /IP₃ durante la diferenciación de los mioblastos (Valdés *et al.*, 2012). En éste trabajo, los mioblastos fueron preincubados con inhibidores farmacológicos para PLC y el receptor de IP₃, y luego fueron estimulados con IGF-1 fisiológico encontrándose una disminución significativa tanto la fosforilación como la actividad transcripcional dependiente de CREB, respaldando los antecedentes sobre las señales de calcio como segundo mensajero que inducen la activación de CREB (Cardenas *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2003; Maldonado *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 2001).

Posteriormente, se procedió a evaluar algunas de las proteínas dependientes de calcio, activadas por IGF-1, que pudieran inducir la activación de CREB. En el caso de la proteína quinasa C (PKC) se observó que tanto el inhibidor de PKC (BimI) como el inhibidor de PKC dependientes de calcio (GO6976) disminuyen la activación de CREB, lo que sugiere que PKC estimula la fosforilación y la transcripción dependiente de CREB. Resultados que también observó un estudio durante la depolarización de las células musculares (Cardenas *et al.*, 2004). Otras dos proteínas de particular interés, fueron la proteína quinasa dependiente del complejo

calmodulina/calcio (CaMK) y la fosfatasa Calcineurina (CaN). En los tratamientos con los inhibidores farmacológicos KN-93 (inhibidor de la CaMK II) y Ciclosporina A (inhibidor de la Calcineurina), se visualizó una considerable disminución con KN-93 tanto en la fosforilación como en la activación transcripcional dependiente de CREB. Sin embargo, con Ciclosporina A no se observaron diferencias en comparación al estímulo con IGF-1 fisiológico. Los resultados presentados muestran semejanzas y diferencias con los antecedentes presentados. En células musculares y cardíacas preincubadas con el inhibidor KN-62 (inhibidor de la CaMK IV) y tratadas con IGF-1 evidenciaron una inhibición en la fosforilación de CREB, y en el presente trabajo se demostró que también la isoforma CaMK II podía ejercer el mismo efecto (Maldonado *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2004). Anteriormente, se ha descrito en líneas celulares de médula adrenal, placenta y fibroblastos que la isoforma CaMK IV es más potente que CaMK II para activar a CREB (Sun *et al.*, 1994). En el caso del tratamiento con Ciclosporina A (inhibidor de la fosfatasa Calcineurina), miotubos C2C12 preincubados con el mismo fármaco y posteriormente estimulados con IGF-1 a concentraciones subfisiológicas encontraron que aumentó significativamente la fosforilación de CREB (Zheng *et al.*, 2004). Por el contrario, en cardiomiocitos preincubados con Ciclosporina A y luego tratados con IGF-1 fisiológico observaron una disminución significativa en la fosforilación de CREB (Maldonado *et al.*, 2005). Una explicación radicaría en la concentración del fármaco utilizada en los experimentos. En células C2C12 utilizaron el doble de concentración, mientras que en cardiomiocitos una décima parte de lo presentado en éste trabajo (Maldonado *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2004). Se infiere en primera instancia que al inhibir a la fosfatasa Calcineurina, debería desfosforilar a CREB generando un aumento en la activación de CREB. Sin embargo, es posible que exista algún intermediario que regule este proceso, como lo plantea una revisión en la que Calcineurina desfosforila al coactivador CRTA para que pueda translocar al núcleo, uniéndose a CREB y estimular su activación (Altarejos y Monminy, 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la Calcineurina, activada por IGF-1, no participa en la activación de CREB durante la diferenciación de los mioblastos.

Cabe mencionar que también se ha descrito que las vías de calcio son activadas tanto por insulina como por IGF-2: En cultivo primario de rata tratados con insulina (50 nM) se produce un incremento rápido y transiente de calcio intracelular, similar a IGF-1, mediante la vía de señalización de PI3K o la vía acoplada a proteína G (Bruton *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha descrito en cardiomiocitos que IGF-2 estimula la vía PLC β para la liberación de calcio, activando a Calcineurina y promoviendo la supervivencia celular (Chu *et al.*, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, se han realizado diversos estudios en células musculares y cardíacas, tratadas con IGF-1, donde han dilucidado que IGF-1 estimula tanto la expresión de la proteína como la del mensajero de *miostatina* (Kurokawa *et al.*, 2009; Shyu *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2007). Para éste trabajo, los mioblastos en fase de diferenciación fueron estimulados a diversas concentraciones de IGF-1 para analizar la actividad promotora y la expresión del mRNA de *miostatina*. Los ensayos realizados mostraron que IGF-1 a concentraciones fisiológicas y suprafisiológicas estimulan la expresión génica de *miostatina*. Los resultados obtenidos en la expresión del mensajero *miostatina* fueron similares a los publicados por el grupo de laboratorio, así como en mioblastos de pollo en diferenciación (Kurokawa *et al.*, 2009; Valdés *et al.*, 2012). Sin embargo, en células C2C12 se observó que IGF-1 induce la expresión de la proteína Miostatina de forma dependiente a la dosis, utilizando concentraciones similares, mientras que los resultados arrojaron que IGF-1 suprafisiológico no superaban tanto la expresión del mensajero como la luminiscencia obtenida con el tratamiento de IGF-1 fisiológico (Yang *et al.*, 2007). Además, en cardiomiocitos tratados con concentraciones suprafisiológicas de IGF-1 (mayores a las del trabajo) mostraron que induce de manera dosis-dependiente la expresión de la proteína Miostatina (Shyu *et al.*, 2005). Por el contrario, un estudio en mioblastos de pollo manifestaron que IGF-1 fisiológico generaba un mayor incremento en la activación transcripcional del promotor de *miostatina* que con concentraciones suprafisiológicas, resultados que se asemejan a lo obtenido (Kurokawa *et al.*, 2009). Una razón es que los tiempos de tratamiento fueron menores a los planteados en los antecedentes, por lo que el uso de un mayor tiempo y concentración podría generar un aumento tanto en la activación transcripcional del promotor como en la expresión del mensajero de *miostatina*.

Existen pocos antecedentes que muestran a IGF-1 como un regulador de la expresión génica de *miostatina*, desconociéndose cuales vías de señalización participan en el proceso (Shyu *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2007). No obstante, se han realizado diversos estudios en la región promotora de *miostatina* (Allen y Du, 2008; Allen y Unterman, 2007; Deng *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2007; Salerno *et al.*, 2004; Spiller *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Complementariamente, nuestro grupo realizó un análisis *in silico* de la secuencia promotora de rata, utilizando el programa MatInspector, donde se encontraron todos

los sitios de unión a factores de transcripción descritos en los antecedentes tales como: los sitios consenso E-box para factores de transcripción miogénicos (como MyoD, Miogenina o Myf5), FoxO, MEF2, CREB, NFAT, SMAD, entre otros. No sólo se encontraron varios sitios de unión a las E-box, como indicaron los antecedentes, dentro de los 2001pb analizados se encontraron 11 sitios de unión a CREB. Aunque se han realizado diferentes estudios, tanto en la región promotora como en la expresión de *miostatina*, ninguno ha analizado el rol del factor de transcripción CREB en regular su expresión génica, a pesar de que se han encontrado varios sitios de unión y uno en la región mínima del promotor. Por lo demás, no se han realizado estudios donde abarquen la mayoría de las vías de señalización activadas por IGF-1 que pudiesen estar regulando la expresión génica de *miostatina*.

De los resultados obtenidos, es interesante destacar la participación de la vía IGF-1R/PI3K en la regulación de la expresión génica de *miostatina*, donde la PI3K estaría jugando un rol pivotal en las vías de señalización durante la diferenciación miogénica. Mioblastos en diferenciación preincubados con inhibidores farmacológicos para proteínas con actividad tirosina quinasa y para PI3K que posteriormente fueron estimulados con IGF-1 fisiológico presentaron una disminución importante en la actividad promotora y en la expresión del mensajero de *miostatina*. Los resultados obtenidos comparten lo publicado previamente por el grupo de laboratorio y con el estudio en células C2C12, sugiriendo que la transcripción de *miostatina* es estimulada por IGF-1 mediante la vía IGF-1R/PI3K (Valdés *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2007). Sin embargo, los ensayos realizados con el inhibidor farmacológico Genisteína no permiten discernir cual de los receptores de IGF-1 estaría participando, aunque se infiere que debería ser el IGF-1R.

Paralelamente, los mioblastos preincubados con inhibidores farmacológicos específicos para las vías MAPKs MEK-ERK1/2 y p38-MAPK, y posteriormente tratadas con IGF-1 fisiológico, generaron una disminución en la expresión génica de *miostatina*. Solamente se ha descrito en células cardíacas que p38-MAPK inducido por IGF-1 estimula la expresión de la proteína Miostatina activando al factor de transcripción MEF2, cuyos resultados concuerdan con los del trabajo (Shyu *et al.*, 2005). No obstante, no se encontraron antecedentes que describan la participación de la vía MEK-ERK1/2 en la regulación transcripcional de *miostatina*, siendo el primer trabajo en estudiarla.

Por último, se encuentra la participación de la vía de señalización PI3K/PLC γ /IP $_3$. Se visualizó una disminución tanto en la expresión del mRNA de *miostatina* como en la actividad

promotora al preincubar los mioblastos con inhibidores farmacológicos y luego estimulados con IGF-1, lo que respalda los resultados obtenidos previamente por el grupo de laboratorio, indicando que la liberación de calcio intracelular de las células musculares podría también regular la expresión génica de *miostatina* (Valdés *et al.*, 2012). Una vez que el calcio es liberado, se activan distintas proteínas dependientes de calcio como CaMK, PKC y CaN. Los mioblastos en diferenciación fueron preincubados con inhibidores farmacológicos específicos para estas proteínas, posteriormente tratados con IGF-1 a concentraciones fisiológicas y finalmente se analizó la actividad promotora y la expresión del mensajero de *miostatina*. Por un lado, se observó en los mioblastos tratados con el inhibidor para PKC dependientes de calcio y CaMK II que la expresión génica de *miostatina* fue reprimida. En el caso de los tratamientos con inhibidores de la proteína quinasa C (PKC), se encontró que sólo el inhibidor para PKC dependientes de calcio inhibe tanto la expresión del mensajero como la actividad promotora de *miostatina*, ya que al emplear un inhibidor genérico de las PKC se observó un efecto similar al de IGF-1, indicando que sólo las isoformas de PKC dependiente de calcio (PKC α , PKC β y PKC γ) estimulan la expresión génica de *miostatina* mediante la activación del factor de transcripción CREB. No se han encontrado antecedentes que mencionen alguna relación con la participación de PKC y CaMK en la regulación de la transcripción de *miostatina*. Por otro lado, los tratamientos con el inhibidor de la fosfatasa Calcineurina, por el contrario, no mostraron diferencias en comparación al estímulo con IGF-1, por lo que no estaría participando en la regulación de la expresión génica de *miostatina* durante la diferenciación de los mioblastos.

Como se indicó con anterioridad, se han realizado diferentes estudios donde determinaron que IGF-1 regula la expresión de *miostatina* en células musculares diferenciadas y que su región promotora posee sitios de unión para el factor de transcripción CREB (Grade *et al.*, 2009; Kurokawa *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2001; Valdés *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguno de ellos realizó algún análisis funcional para determinar si CREB participaba en ese proceso. En éste trabajo se utilizó un RNA interferente pequeño específico para CREB el cual generó una disminución importante en la expresión génica de *miostatina* estando muy cerca de los niveles basales. Este resultado concuerda con lo esperado, ya que el promotor de *miostatina* de rata presenta una gran cantidad de sitios de unión CRE, incluyendo el sitio conservado entre especies en la región basal mencionado en los antecedentes. No obstante, en los experimentos de co-transfección con vector reportero se observó que los tratamientos con el estímulo de IGF-1

fisiológico o con IGF-1 más siRNA no relacionado (NR) mostraron un aumento menor en la actividad transcripcional, el cual se generaría producto de una competencia entre siRNA y vectores reporteros transfectados. Este es el primer estudio que demuestra que el factor de transcripción CREB regula la expresión génica de *miostatina* durante la diferenciación de los mioblastos.

En base a los resultados obtenidos se propone un modelo (**Figura 17**): Durante la diferenciación de los mioblastos, IGF-1 se une a su receptor IGF-1R para activar una cascada de señalización que involucra 3 vías principales a través de IRS. En ellas se encuentran las vías de las MAPKs MEK-ERK1/2 y p38-MAPK para la activación del factor de transcripción CREB. Otra vía de señalización está constituida por PI3K/PLC γ que permite generar IP₃, luego éste difunde al citosol y ubica a su receptor IP₃R en el retículo sarcoplásmico para generar la liberación de calcio al espacio intracelular. Las señales de calcio inducen de modo transiente la activación de proteínas quinasas como PKC y CaMK que podrán fosforilar a CREB. Así, éste podrá unirse a los sitios CRE del promotor de *miostatina* y regular su expresión.

Este proyecto ha logrado determinar las distintas vías de señalización activadas por IGF-1 para estimular al factor de transcripción CREB y sumado con la publicación presentada por nuestro grupo de laboratorio son los primeros en demostrar la participación de la vía de calcio en regular la expresión génica de *miostatina* en el músculo esquelético. Los resultados obtenidos sugieren que durante el proceso miogénico la expresión génica se ve alterada por un mecanismo de retroalimentación negativa, la cual es regulada por un balance entre las vías de señalización activadas por IGF-1 y Miostatina que promueven la proliferación y la diferenciación de las células musculares.

La información obtenida en esta indagación contribuirá a ampliar el conocimiento que buscan diversos estudios sobre la regulación de la miogénesis y como se mantienen balanceadas las señales de crecimiento endógenas en el desarrollo muscular, teniendo aplicaciones potenciales en el campo de la biotecnología biomédica. Con el propósito de tratar diversas miopatías, se han fijado como objeto de observación a los factores de crecimiento, dentro de los cuales IGF-1 y Miostatina han mostrado importantes avances en diversos modelos para tratar éstas enfermedades (Clemmons, 2009; Joulia-Ekaza y Cabello, 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos no han logrado ser suficientes para definir el mejor tratamiento. El proyecto de tesis, en conjunto a los antecedentes presentados, pretende incorporar al factor de transcripción CREB como blanco de

estudio, por ejemplo, para la utilización de terapia génica mediante la administración de un constructo de CREB cuyo transgen sea dirigido por un promotor músculo-específico, con estructura y funcionalidad que se mantenga activa para promover el crecimiento, desarrollo y regeneración de las células musculares (Altarejos y Montminy, 2011; Chen *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2011).

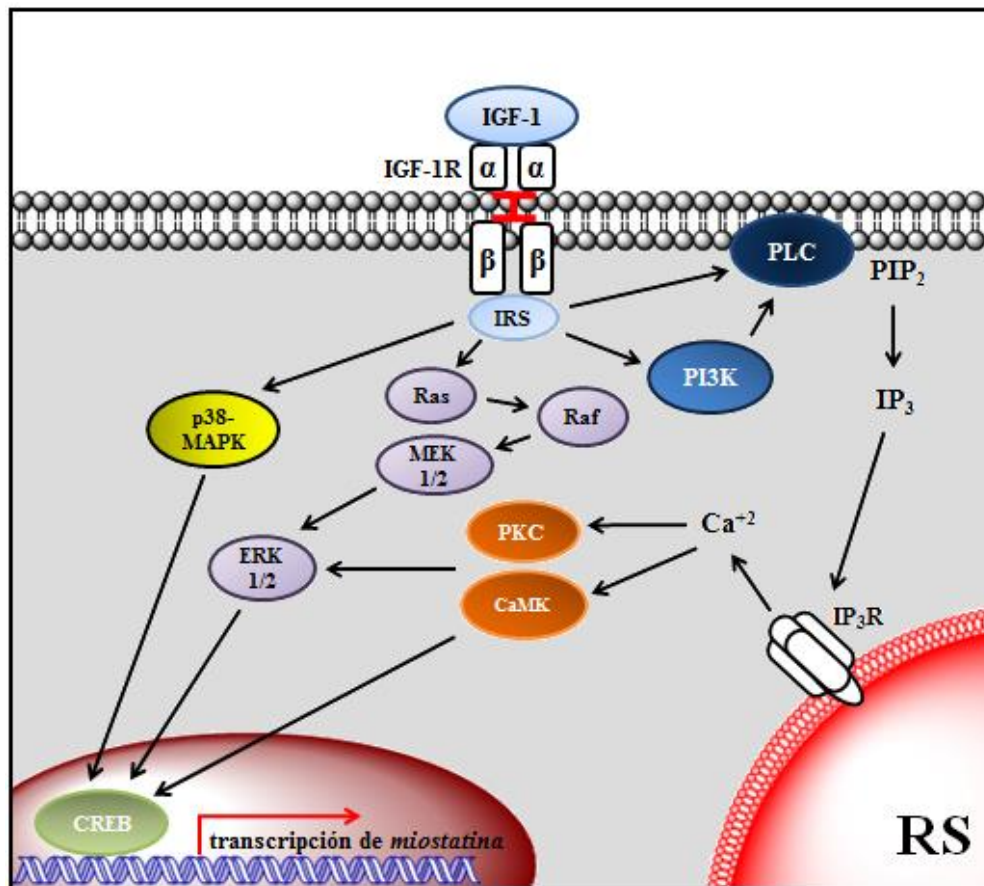


Figura 17: Modelo de las vías de señalización activadas por IGF-1 que activan a CREB en la regulación génica de miostatina.

IX. CONCLUSIÓN

1. IGF-1 induce la fosforilación y la activación transcripcional dependiente de CREB.
2. IGF-1, mediante las vías de señalización MEK-ERK 1/2, p38-MAPK, PI3K/PLC γ /IP $_3$ y proteínas dependientes de calcio como PKC y CaMK, estimula la activación de CREB.
3. IGF-1 induce la activación transcripcional del promotor y la expresión del mensajero de *miostatina*.
4. IGF-1, mediante las vías de señalización MEK-ERK 1/2, p38-MAPK, PI3K/PLC γ /IP $_3$ y proteínas dependientes de calcio como PKC y CaMK, estimula la expresión génica de *miostatina*.
5. El factor de transcripción CREB regula la activación transcripcional del promotor y la expresión del mensajero de *miostatina*.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott K., Friday B., Thaloor D., Murphy T. and Pavlath G. (1998) Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell*; 9: 2905–16.
- Adi S, Bin-Abbas B, Wu N. and Rosenthal S. (2002) Early stimulation and late inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation by IGF-I: a potential mechanism mediating the switch in IGF-I action on skeletal muscle cell differentiation. *Endocrinology*; 143(2): 511-6.
- Allen L. and Du M. (2008) Comparative functional analysis of the cow and mouse myostatin genes reveals novel regulatory elements in their upstream promoter regions. *Comp Biochem and Physio Part B*; 150: 432-39.
- Allen L. and Leinwand L. (2002) Intracellular calcium and myosin isoform transitions. Calcineurin and calcium-calmodulin kinase pathways regulate preferential activation of the IIa myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem*; 277(47): 45323-30.
- Allen L. and Unterman T. (2007) Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *Am J Physiol Cell Physiol*; 292(1):C188-99.
- Altarejos J. and Montminy M. (2011) CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews Molec Cell Bio*; 12: 141-51.
- Berdeaux R., Goebel N., Banaszynski L., Takemori H., Wnadless T., Shelton D. and Montminy M. (2007) SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature Med*; 13(5): 597–603.
- Biressi S., Molinaro M. and Cossu G. (2007) Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev Biol*; 308(2):281-93.
- Bito H. and Takemoto-Kimura S. (2003) Ca(2+)/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival. *Cell Calcium*; 34: 425-30.

- Bodine S., Stitt T., Gonzalez M., Kline W., Stover G., Bauerlein R., Zlotchenko E., Scrimgeour A., Lawrence J., Glass D., Yancopoulos G. (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*; 3(11): 1014-9.
- Brodie C., Khaliq M., Yin J., Clark B., Orr H. and Boland L. (2004) Overexpression of CREB reduces CRE-mediated transcription: behavioral and cellular analyses in transgenic mice. *Mol. Cell. Neurosci*; 25: 602– 11.
- Bruton J., Katz A. and Westerblad H. (2001) The role of Ca²⁺ and calmodulin in insulin signalling in mammalian skeletal muscle. *Acta Physio Scand*; 171: 259–65.
- Cardenas C., Müller M., Jaimovich E., Pérez F., Buchuk D., Quest A. and Carrasco M. (2004) Depolarization of Skeletal Muscle Cells induces Phosphorylation of cAMP Response Element Binding Protein via Calcium and Protein Kinase Ca. *J Biol Chem*; 279 (37): 39122–131.
- Cargnello M. and Roux P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*; 75 (1):50-83.
- Carrasco M., Riveros N., Rios J., Muller M., Torres F., Pineda J., Lantadilla S. and Jaimovich E. (2003) Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol*; 284: C1438-C47.
- Chargé S. and Rudnicki M. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*; 84 (1): 209–38.
- Chen A., Ginty D. and Fan C. (2005) Protein kinase A signaling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature*; 433 (7023): 317-22.
- Chu C., Tzang B., Chen L., Liu C., Tsai F., Tsai C., Lin J., Kuo W., Bau D., Yao C. and Huang C. (2009) Activation of insulin-like growth factor II receptor induces mitochondrial-dependent apoptosis through Gαq downstream calcineurin signaling in myocardial cells. *Endocrinology*; 150 (6): 2723-31.
- Clemmons D. (2009) Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab*; 20 (7): 349-56.
- Conejo R., Valverde A., Benito M. and Lorenzo M. (2001) Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblast by induction of NF-κB and downregulation of AP-1 activities. *Jor of Cell Physio*; 186: 82-94.

- Cypess A., Zhang H., Shulz T., Huang T., Espinoza D., Kristiansen K., Unterman T. and Tseng Y. (2011) Insulin/IGF-1 regulation of necdin and brown adipocyte differentiation via CREB- and FoxO1- associated pathways. *Endocrinology*; 152 (10): 3680-3689.
- Denley A., Cosgrove L., Booker G., Wallace J. and Forbes B. (2005) Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev*; 16: 421-39.
- Deng B., Wen J., Ding Y., Gao Q., Huang H., Ran Z., Qian Y., Peng J. and Jiang S. (2012) Functional analysis of pig myostatin gene promoter with some adipogenesis- and myogenesis-related factors. *Mol Cell Biochem*; 363: 291-99.
- Du R., An X., Chen Y. and Qin J. (2007) Some motifs were important for Myostatin transcriptional regulation in Sheep (*Ovis aries*). *Jor Bio and Mol Biol*; 40 (4): 547-53.
- Ebisawa T., Fukuchi M., Murakami G., Chiba T., Tanaka K., Imamura T., Miyazono K. (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem*; 276: 12477–80.
- Engert J., Berglund E. and Rosenthal N. (1996) Proliferation precedes differentiation in IGF-1- stimulated myogenesis. *J Cell Biol*; 135: 431-40.
- Espinosa A., Estrada M. and Jaimovich E. (2004) IGF-I and insulin induce different intracellular calcium signals in skeletal muscle cells. *Jour of Endoc*; 182: 339-51.
- Fernández M., Sánchez-F.F., Palacios N., Sánchez I. and Cacicedo L. (2005) IGF-1 and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate cAMP-response element-binding protein (CREB)-dependent transcription via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in pituitary cells: requirement of Rap1. *J Molec Endo*; 34: 699-712.
- Friday B., Horsley V. and Pavlath G. (2000) Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol*; 149: 657–66.
- Grade C., Salerno M., Schubert F., Dietrich S. and Alvares L. (2009) An evolutionarily conserved *Myostatin* proximal promoter/enhancer confers basal levels of transcription and spatial specificity in vivo. *Des Genes Evol*; 219: 497-508.
- Grand F. and Rudnicki M. (2007) Skeletal muscle satellite cells and adult miogenesis. *Curr Opin Cell Biol*; 19(6): 628–33.
- Hayakawa J., Ohmichi M., Tasaka K., Kanda Y., Adichi K., Nishio Y., Hisamoto K., Mabuchi S., Hinuma S. and Murata Y. (2002) Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein. *Endocrinology*; 143 (1): 13-22.

- Joulia D., Bernardi H., Garandel V., Rabenoelina F., Vernus B., Cabello G. (2003) Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res*; 286: 263–275.
- Joulia-Ekaza D. and Cabello G. (2006) Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res*; 312: 2401–14.
- Kaliman P., Canicio J., Testar X., Palacín M. and Zorzano A. (1999) Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor- κ B and inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *Jor of Bio Chem*; 274 (25): 17437-44.
- Kim H., Barton E., Muja N., Yakar S., Pennisi P. and LeRoith D. (2005) Intact insulin and insulin-like growth factor-1 receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function *in vivo*. *Endocrinology*; 146 (4): 1772-79.
- Klemm D., Leitner W., Watson P., Nesterova A., Reusch J., Goalstone M. and Draznin B. (2001) Insulin-induced adipocyte differentiation. *Jor of Biol Chem*; 276 (30): 28430-35.
- Kurokawa M., Fuminori S., Shinya A., Tomoki S., Nobuhiko Y. and Masa-aki H. (2009) Monitor of the myostatin autocrine action during differentiation of embryonic chicken myoblasts into myotubes: effect of IGF-I. *Mol Cell Biochem*: 331:193–199.
- Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-85.
- Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S. and Kambadur R. (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem*. 277(51):49831-40.
- Latres E., Amini A., Amini A., Griffiths J., Martin F., Wei Y., Lin H., Yancopoulos G. and Glass D. (2005) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem*; 280 (4): 2737-44.

- Lee S. (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 20: 61-86.
- Leloup L., Daury L., Mazères G., Cottin P. and Brustis J. (2007) Involvement of the ERK/MAP kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration. *Int J Biochem Cell Biol*; 39 (6):1177-89.
- Li J. and Johnson S. (2006) ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*; 345(4):1425-33.
- Linnerth N., Baldwin M., Cambell C., Brown M., McGowan H. and Moorehead R. (2005) IGF-II induces CREB phosphorylation and cell survival in human lung cancer cells. *Oncogene*; 24: 7310-19.
- Ma K., Mallidis C., Artaza J., Taylor W., Gonzalez-Cadavid N. and Bhasin S. (2001) Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 281 (6): E1128-36.
- Maffucci T. and Falasca M. (2007) Phosphoinositide 3-kinase-dependent regulation of phospholipase C gamma. *Biochem Soc Trans*; 35: 229-30.
- Maldonado C., Cea P., Adasme T., Collao A., Díaz-Araya G., Chiong M. and Lavandero S. (2005) IGF-1 protects cardiac myocytes from hyperosmotic stress-induced apoptosis via CREB. *Biochem Biophys Res Commun*; 336: 1112-18.
- Mayr M., Canettieri G. and Montminy M. (2001) Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *PNAS*; 98 (19): 10936-41.
- Mayr M., Guzman E., and Montminy M. (2005) Glutamine rich and basic region/leucine zipper (bZIP) domains stabilize cAMP-response element-binding protein (CREB) binding to chromatin. *J. Biol. Chem*; 280 15103-110.
- McPherron A., Lawler A. and Lee S. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*; 387: 83–90.
- Mehrhof M., Müller, M., Bergmann, M., Peifeng L., Yibin W., Wilhelm S., Rainer D. and Rüdiger H. (2001) In Cardiomyocyte Hypoxia, Insulin-Like Growth Factor-I-Induced Antiapoptotic Signaling Requires Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-Dependent and Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Activation of the Transcription Factor cAMP Response Element-Binding Protein. *Circulation*; 104: 2088-94.

- Michel R., Chin E., Chakkalakal J., Eibl J. and Jasmin B. (2007) Ca²⁺/calmodulin-based signalling in the regulation of the muscle fibre phenotype and its therapeutic potential via modulation of utrophin A and myostatin expression. *Appl Physiol Nutr Metab*; 32 (5): 921-9.
- Moorehead R., Sanchez O., Baldwin M. and Khokha R. (2003) Transgenic overexpression of IGF-II induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma. *Oncogene*; 22: 853-57.
- Musaro A., McCullagh K., Paul A., Houghton L., Dobrowolny G., Molinaro M., Barton E., Sweeney H. and Rosenthal N. (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*; 27(2): 195-200.
- Musaro A. and Rosenthal N. (1999) Maturation of the myogenic program is induced by postmitotic expression of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol*; 19: 3115–24.
- O'Connor R., Mills S., Jones K., Ho S. and Pavlath G. (2005) A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis. *J Cell Sci*; 120: 149–59.
- Patel K. and Amthor H. (2005) The function of myostatin and strategies of myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscular disorders*; 15: 117-26.
- Perez-Ruiz A., Gnocchi V. and Zammit P. (2007) Control of Myf5 activation in adult skeletal myonuclei requires ERK signalling. *Cell Signal*; 19 (8): 1671-80.
- Philippou A., Maridaki M., Halapas A. and Koutsilieris M. (2007) The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *In Vivo*; 21 (1): 45-54.
- Powell J., Carrasco M., Adams D., Drouet B., Rios J., Muller M., Estrada M. and Jaimovich E. (2001) IP3 receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca²⁺ signaling pathway in skeletal muscle. *Journal of Cell Science*; 114: 3673–83.
- Rodgers B. (2005) Insulin-like growth factor-I downregulates embryonic myosin heavy chain (eMyHC) in myoblast nuclei. *Growth Horm IGF Res*; 15: 377–83.
- Rommel C., Bodine S., Clarke B., Rossman R., Nunez L., Stitt T., Yancopoulos G. and Glass D. (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*; 3: 1009–13.

- Salerno MS., Thomas M., Forbes D., Watson T., Kambadur R. and Sharma M. (2004) Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter . *Am J Physiol Cell Physiol*; 287 (4):C1031-40.
- Sarbassov D. and Peterson C. (1998) Insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase regulate extracellular signal-regulated kinase-dependent and -independent signaling pathways during myogenic differentiation. *Mol Endocrinol*; 12 (12):1870-8.
- Semsarian C., Wu M., Ju Y., Marciniak T., Yeoh T., Allen D., Harvey R. and Graham R. (1999) Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺ dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*; 400(6744): 576-81.
- Sharma M., Kambadur R., Matthews K., Somers W., Devlin G., Conaglen J., Fowke P. and Bass J. (1999) Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*; 180: 1-9.
- Shyu K., Ko W., Yang W., Wang B. and Kuan P. (2005) Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*; 68: 405 – 14.
- Simon P. (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*; 19 (11): 1439-40.
- Sirotkin A. and Grossmann R. (2003) Role of tyrosine kinase- and MAP kinase-dependent intracellular mechanisms in control of ovarian functions in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) and in mediating effects of IGF-II. *Jor of Reprod and Develop*; 49 (1): 99-106.
- Somwar R., Perreault M., Kapur S., Taha C., Sweeney G., Ramlal T., Kim D., Keen J., Coté, Klip A. and Marette A. (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase α and β by insulin and contraction in rat skeletal muscle. *Diabetes*; 49: 1794-1800.
- Spiller M., Kambadur R., Jeanplong F., Thomas M., Martyn J., Bass J. and Sharma M. (2002) The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol*; 22 (20): 7066-82.

- Stewart R., Flechner L., Montminy M. and Berdeaux R. (2011) CREB is activated by muscle injury and promotes muscle regeneration. *Plos one*; 6 (9): e24714.
- Sun L., Liu L., Yang X. and Wu Z. (2004) Akt binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation. *J Cell Sci*; 117(Pt 14): 3021-9.
- Sun P., Enslin H., Myung P. and Maurer R. (1994) Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev*; 8: 2527–39.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S. and Bass J. (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*; 275(51): 40235–43.
- Valdes J., Flores S., Fuentes E., Osorio-Fuentealba C., Jaimovich E. and Molina A. (2012) IGF-1 induces IP3 dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, manuscrito aceptado con modificaciones.
- Wu Z., Woodring P., Bhakta K., Tamura K., Wen F., Feramisco J., Karin M., Wang J. and Puri P. (2000) p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol and Cel Bio*; 20 (11): 3951-64.
- Xu C., Wu G., Zohar Y. and Du S. (2003) Analysis of *myostatin* gene structure, expression and function in zebrafish. *Jor. Experim Bio*; 206: 4067-79.
- Xu Q. and Wu Z. (2000) The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J Biol Chem*; 275 (47): 36750-7.
- Yang W., Zhang Y., Li Y., Wu Z. and Zhu D. (2007) Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *J Biol Chem*; 282 (6): 3799-808.
- Zetser A., Gredinger E. and Bengal E. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*; 274: 5193 – 200.

- Zheng W. and Quirion R. (2006) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induces the activation/phosphorylation of Akt kinase and cAMP response element-binding protein (CREB) by activating different signaling pathways in PC12 cells. *BMC Neuro*; 7 (1): 51-10.
- Zheng Z., Wang Z. and Delbono O. (2004) Ca²⁺ calmodulin kinase and calcineurin mediate IGF-1-induced skeletal muscle dihydropyridine receptor alpha (1S) transcription. *J Membr Biol*; 197(2): 101-112.
- Zhu X., Topouzis S., Liang L., Stotish R. (2004). Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine*; 26: 262-72.