

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

Tesis para optar por el título de Doctor en Medicina

**Determinantes de la Fuerza Específica de  
Contracción en el Músculo Esquelético del Ratón  
Geronte.**

**Participación de  $Ca_v1.1$ , Troponina T, Calpaínas y la  
Interacción Músculo-Tejido Adiposo.**

Autor: Méd. Andrea Soledad Pereyra

Director: Dra. Claudia B. Hereñú

Co-director: Dr. Osvaldo Delbono

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Prof. Dr.  
Rodolfo R. Brenner”, CONICET-UNLP, La Plata, BA, Argentina**

**Department of Internal Medicine-Gerontology, Wake Forest  
University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA**

*Esta Tesis Doctoral está dedicada a la Educación Pública,  
Universal y Gratuita.*

En la vertiginosa espiral de la escritura de la tesis a veces uno se reconoce sediento de inspiración y la busca desesperadamente...ella está en todos lados, en todos los objetos, en todas las representaciones, en todos los recuerdos, en todas las canciones. A veces creemos que buscamos inspiración pero en realidad lo que buscamos es una guía cuasi teórico-práctica de cómo continuar nuestra Discusión, cómo presentar los Resultados, que interlineado usar, cómo separar los capítulos....en resumen, buscamos una tesis consumada que sirva de hermana mayor (o salvavidas) a la nuestra y la lleve de la mano....La que yo encontré rezaba las siguientes palabras, dedicadas por la mentora a su tesista *“A solas, la tesis y vos se hacen compañía. Qué importan los cut and paste y los programas que se han cerrado? Un corazón inteligente se mira en su manuscrito y el manuscrito le responde...yo soy tu espejo”*.

Durante mucho tiempo pensé que tipo de espejo sería entonces mi manuscrito y qué me devolvería al mirarlo...Primero pensé en el reflejo del caos, de fechas límite incumplidas, de plazos postergados, de más caos....reflejo de días de furia y angustia, de insatisfacción, de frustración, del abatimiento de sentir que “no puedo”. Pobre mi manuscrito....tan incomprendido, tan solo....Afortunadamente, como para ser buen científico hay que tener sentido de la autocrítica, no pude refrenar ese sentimiento de culpa por mirar a mi manuscrito con los ojos equivocados....porque cuando uno ve mal a veces es que mira mal....que como diría el poeta, no es lo mismo pero es igual. Y ahí, en la imponente intangibilidad de su existencia digital me devolvió, al mirarlo nuevamente, otros reflejos....el de la perseverancia, el trabajo duro, el compromiso inagotable, la pasión abrumadora, la entrega desmedida, la obstinación y la terquedad, el amor puesto en cada pequeña cosa, el orgullo, el querer más...siempre más. El debate sobre cuál es el manuscrito fiel que refleja mi verdadera esencia es fútil y fugaz.... en ambos existo, en ambos soy.

Y así, en la hora final de su existencia, este manuscrito que pronto será una de esas tesis consumadas me devuelve el último y mejor de sus reflejos....el de un camino por venir... lleno de sueños, aventuras y sin sillas....

*Andrea S. Pereyra*

*La Plata, Diciembre de 2015*

## AGRADECIMIENTOS

*Fiel reflejo del trabajo solitario y a la vez en equipo, de las manos solidarias y de los oídos compasivos, esta tesis no hubiera existido como tal sin el apoyo moral, técnico y afectivo de las personas que aquí menciono y aún más sin el sostén de las que omito... A todas ellas el más grande, sincero y humilde GRACIAS!*

A mi familia, los que están en este mundo y los que vagan por otros más lejanos. Porque ellos hicieron el molde para que yo lo rompa... gracias por comprenderme distinta, gracias por amarme así.

A mi hermana Romina que la amo.

A mis amigos de la vida, del estudio, del trabajo, de las circunstancias... a los de aquí y los de allá que me esperan para conquistar el mundo.

A mis directores de beca y tesis doctoral, Claudia Hereñú y Osvaldo Delbono. Gracias por la confianza y la oportunidad. Ambos hicieron de mí una mejor persona con su liderazgo y ejemplo. Gracias por cuidar de esta semilla de científico loco que incipientemente comienza a germinar.

A mi segunda casa, mi querida Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. Yo te siento viva. Gracias por permitirme seguir aquí un tiempo más.

A todo el Laboratorio del Dr. Rodolfo Goya (INIBIOLP, CONICET-UNLP), pasado y presente. Creo que hace falta expresar aquí cuanto los quiero y cuanto los valoro. Celebro todo, lo bueno y lo malo, lo lindo y lo feo. Gracias por quererme y valorarme como profesional.

A mi segunda familia científica, los miembros del laboratorio del Dr. Delbono (Wake Forest University School of Medicine, NC, USA) que me adoptaron como una más y transformaron mi vida. Gracias Zhong-Min Wang por tu paciencia y cariño, por hacer de mi estadía allí una aventura de aprendizaje cada día. Gracias Laura por la dulzura.

A todo el personal del INIBIOLP que me ha visto vagar por los pasillos desde el año 2004 a veces sabiendo quien era, a veces no.

A mi amada Cátedra de Biología de la FCM. Creo que por culpa de quienes la habitan yo seguí este camino. No podría haber elegido un mejor lugar para hacer lo que más amo....tratar de enseñar a veces, dar todo lo mejor siempre.

Al Dr. Francisco Sánchez del Instituto de Física La Plata por su ayuda siempre y paternalismo del bueno.

A quienes me ayudaron a concretar horas maratónicas de trabajo experimental en WFUSM, en especial Clark Files, Chun Liu, Xing Feng y Elizabeth Forbes, por ser ellos buenos profesionales pero sobre todo buena gente.

Por último, quiero agradecer (1) al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina por otorgarme en el año 2011 la Beca Doctoral que me permitió iniciar mi carrera en esto que llamamos ciencia; (2) a la Facultad de Ciencias Médicas y a la Universidad Nacional de La Plata por aceptarme como Doctorando.

## TABLA DE CONTENIDOS

PARTE I - INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
1) Breve reseña anatómica, histológica y fisiológica del músculo esquelético.....	10
2) Breve reseña de las bases moleculares de la contracción muscular.....	12
3) Subtipos de fibras musculares.....	13
4) Canal de Calcio Tipo L voltaje-dependiente ( $Ca_v1.1$ ).....	14
5) Envejecimiento y sarcopenia.....	15
6) Sistemas proteolíticos en el Músculo Esquelético – Rol de las calpaínas.....	17
PARTE II - OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
PARTE III – DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	21
CAPITULO I.....	21
Efecto De La Inhibición Del Sistema De Calpaínas Sobre La Generación De Fuerza Muscular En Ratonés Gerontes.....	21
I.A    INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS.....	22
I.B    RESULTADOS.....	25
<b><i>I.B.1. La administración de BDA-410 inhibe la actividad proteolítica endógena de las calpaínas en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 de 23 meses de edad.....</i></b>	<b>25</b>
<b><i>I.B.2. La inhibición de calpaínas incrementa la fuerza muscular ex vivo en los ratones C57BL/6 gerontes.....</i></b>	<b>26</b>
<b><i>I.B.3. La inhibición de calpaínas no modifica la resistencia a la fatiga muscular ex vivo e in vivo en los ratones C57BL/6 gerontes.....</i></b>	<b>30</b>
<b><i>I.B.4. La inhibición de calpaínas no modifica el contenido total de las principales proteínas motoras/contráctiles del músculo esquelético ni el perfil miofibrilar en los ratones C57BL/6 gerontes.....</i></b>	<b>32</b>
<b><i>I.B.5. La inhibición de calpaínas modifica el perfil de fragmentación de TnT3 en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes.....</i></b>	<b>35</b>
<b><i>I.B.6. La inhibición de calpaínas restaura los niveles de Cav1.1 en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes.....</i></b>	<b>37</b>
<b><i>I.B.7. La administración de BDA-410 disminuye los niveles de PPP1R12B, la subunidad reguladora de una fosfatasa de miosina, en el músculo esquelético de ratones gerontes....</i></b>	<b>38</b>
I.C    DISCUSIÓN.....	39
I.D    MATERIALES Y METODOS.....	45
1) <b>Ámbito del estudio.....</b>	<b>45</b>
2) <b>Diseño metodológico.....</b>	<b>45</b>
3) <b>Características de los animales de experimentación. Criterios de selección.....</b>	<b>46</b>
4) <b>Inhibidor de Calpaínas BDA-410.....</b>	<b>48</b>
5) <b>Administración de BDA-410 in vivo. Protocolo de tratamiento.....</b>	<b>49</b>
6) <b>Ensayo in vitro de inhibición de calpaínas.....</b>	<b>49</b>

7) Obtención y preparación de músculos esqueléticos.....	50
8) Anticuerpos.....	53
9) Determinación de la fatigabilidad muscular in vivo .....	53
10) Determinación de la fatigabilidad muscular in vivo. ....	54
11) Evaluación de la fuerza de agarre.....	54
12) Determinación de la fuerza muscular ex vivo.....	55
13) Perfil proteico total (Proteómica) .....	56
14) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot para fosfatasa PPP1R12B.....	57
15) Análisis estadístico.....	58
CAPITULO II. ....	59
Efecto De La Inhibición Del Sistema De Calpaínas Sobre El Peso Corporal, El Contenido Graso Total Y La Interacción Músculo Esquelético-Tejido Adiposo En Ratones Gerontes.....	59
II.A INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS .....	60
II.B RESULTADOS.....	63
<i>II.B.1. El peso y el contenido de grasa corporal disminuyen luego de la administración de BDA-410 en ratones C57BL/6 gerontes. ....</i>	<i>63</i>
<i>II.B.2. La ingesta calórica e hídrica no se modifica luego de la administración de BDA-410.....</i>	<i>65</i>
<i>II.B.3. La administración de BDA-410 no modifica la actividad locomotriz espontánea en ratones C57BL/6 gerontes.....</i>	<i>66</i>
<i>II.B.4. La composición miofibrilar de músculos rápidos y lentos no se modifica luego de la administración de BDA-410 en ratones C57BL/6 gerontes. ....</i>	<i>69</i>
<i>II.B.5. Genes involucrados en la captación, procesamiento y oxidación de los ácidos grasos se encuentran sobre expresados en músculo esquelético luego de la administración de BDA-410.....</i>	<i>70</i>
<i>II.B.6. Los genes de mioquinas mediadoras de la lipólisis se sobre-expresan en el músculo esquelético luego de la administración de BDA-410.....</i>	<i>76</i>
<i>II.B.7. Genes asociados a un fenotipo corporal delgado se encuentran sobre-expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410. ....</i>	<i>77</i>
<i>II.B.8. Genes asociados al aparato contráctil y su regulación se encuentran diferencialmente expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410.....</i>	<i>77</i>
<i>II.B.9. Genes asociados a factores moduladores de la transcripción se encuentran diferencialmente expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410.....</i>	<i>78</i>
<i>II.B.10. Genes asociados a la respuesta al estrés oxidativo se encuentran sobre-expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410. ....</i>	<i>79</i>

II.C	DISCUSIÓN .....	80
II.D	MATERIALES Y METODOS .....	91
1)	Ámbito del estudio.....	91
2)	Diseño metodológico.....	91
3)	Características de los animales de experimentación. Criterios de selección.....	91
4)	Inhibidor de Calpaínas BDA-410.....	91
5)	Administración de BDA-410 in vivo. Protocolo de tratamiento.....	91
6)	Ensayo in vitro de inhibición de calpaínas.....	91
7)	Obtención y preparación de músculos esqueléticos. ....	91
8)	Determinación ex vivo de las dimensiones anatómicas del músculo esquelético. ....	91
9)	Determinación del peso y la composición corporal. ....	92
10)	Determinación de la ingesta de calórica e hídrica. ....	93
11)	Registro de la actividad locomotriz espontanea. ....	94
12)	Procesamiento del microarray de ARN (transcriptoma), análisis estadístico y de minería de datos .....	95
13)	Análisis estadístico.....	96
CAPITULO III.....		97
Transferencia Génica Al Músculo Esquelético Postnatal Mediante Magneto-Adenovectores. ....		97
<i>Prueba De Concepto De Una Metodología Emergente. ....</i>		97
III.A	INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS .....	99
III.B	RESULTADOS.....	102
	<i>III.B.1. Preparación y caracterización de nanopartículas magnéticas y magneto-adenovectores .....</i>	102
	<i>III.B.2. La transferencia génica con vectores adenovirales desnudos posee baja eficacia en miotúbulos maduros de la línea celular C2C12. ....</i>	105
	<i>III.B.3. La magnetofección mejora la transferencia génica mediada por adenovectores virales en mioblastos y miotubulos de la línea C2C12 .....</i>	107
	<i>III.B.4. La transferencia génica mediada por magnetofección genera mayores niveles de IGF-1 secretado y por un tiempo más sostenido que cuando se utilizan vectores adenovirales desnudos.....</i>	110
	<i>III.B.5. El campo magnético es un componente fundamental de la magnetofección. ....</i>	111
	<i>III.B.6. Dinámica de la captación celular de los magneto-adenovectores. ....</i>	113
	<i>III.B.7. Magnetofección in vivo en músculo esquelético murino postnatal.....</i>	117
III.C	DISCUSIÓN .....	119
III.D	MATERIALES Y MÉTODOS .....	126
1)	Ámbito del estudio.....	126
2)	Cultivos celulares de Miotúbulos y Mioblastos.....	126



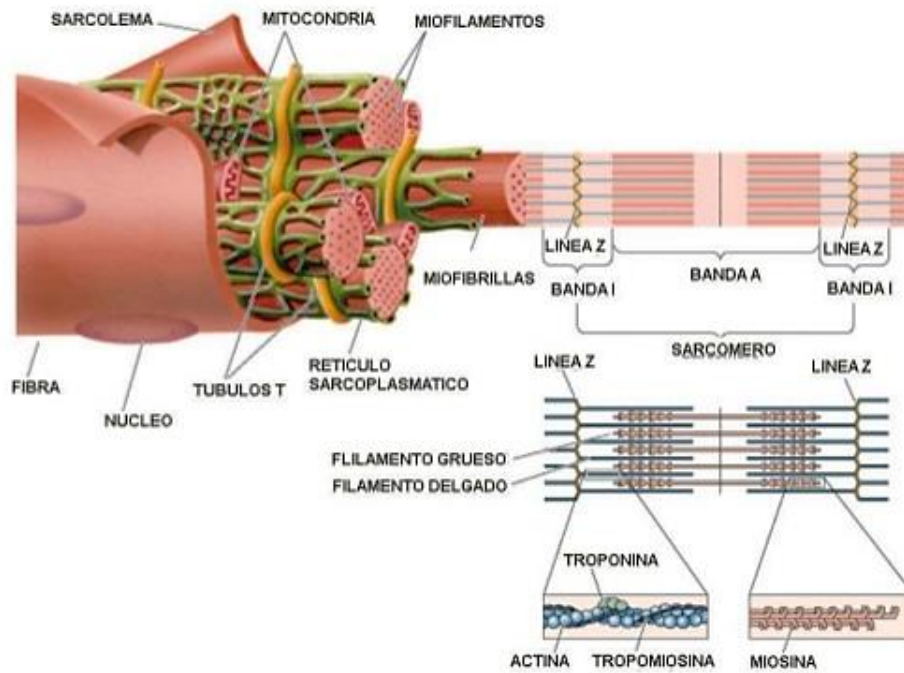
3) Nanopartículas magnéticas (NPMs) y aplicadores de campo magnético. ....	126
4) Vectores adenovirales recombinantes RAd-IGF-1 y RAD-GFP .....	127
5) Autoensamblado de magneto-adenovectores y transferencia de genes <i>in vitro</i> . ....	128
6) Transferencia génica <i>in vivo</i> asistida por magneto-adenovectores .....	129
7) Caracterización de los magneto-adenovectores .....	130
8) Adquisición de imágenes fluorescentes.....	131
9) Cuantificación de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). ....	131
10) Medidas de IGF-1.....	132
11) Adquisición de imágenes de microscopía electrónica de transmisión.....	132
12) Análisis estadístico.....	133
PARTE IV - DISCUSION GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....	134
PARTE V – CONCLUSIONES .....	139
PARTE VI - BIBLIOGRAFIA .....	141

## PARTE I - INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1) Breve reseña anatómica, histológica y fisiológica del músculo esquelético.

El músculo esquelético (ME) constituye el tejido más abundante del organismo y representa aproximadamente el 40% del peso corporal total. La función principal y clásica del tejido muscular es la de producir movimiento y generar fuerza pero como se mencionará en detalle luego, su rol como regulador de la homeostasis energética general es de vital importancia. La unidad funcional y estructural del músculo maduro es la miofibra, verdadero sincitio multinucleado que se extiende de tendón a tendón y cuyo diámetro puede variar entre 5 a 100  $\mu\text{m}$  en el músculo humano. En su nivel de organización *macro* varias miofibras se agrupan para formar un haz o fascículo y varios fascículos se agrupan luego para dar lugar a un músculo. En su nivel de organización sub-celular, la miofibra se puede descomponer en estructuras denominadas miofibrillas, que poseen su misma longitud y están constituidas por repeticiones en tándem de la unidad contráctil, el sarcómero (**Figura 1**).

El aparato contráctil está compuesto por un conjunto de filamentos gruesos y finos interdigitados entre sí y una variedad de proteínas accesorias. Su organización espacial específica es responsable de la estriación cruzada característica. Los filamentos gruesos están formados por miosina, una molécula con capacidad ATPasa en sus subunidades *pesadas* y subunidades o cadenas *livianas* cuya regulación determinan la cinética de la contracción. Los filamentos finos se componen principalmente de actina y proteínas accesorias como la troponina y la tropomiosina en un arreglo repetido que incluye cada siete moléculas o monómeros de actina G una molécula de tropomiosina y una de troponina con sus tres subunidades, troponina T (unión a tropomiosina), I (inhibidora) y C (sensor de calcio) (**Figura 1**) (**Mattiuzzi, 2002**).



**Figura 1. Organización estructural del Músculo Esquelético y la Miofibrila.** El presente esquema muestra la organización estructural del músculo en su conjunto y del aparato contráctil sub-celular.

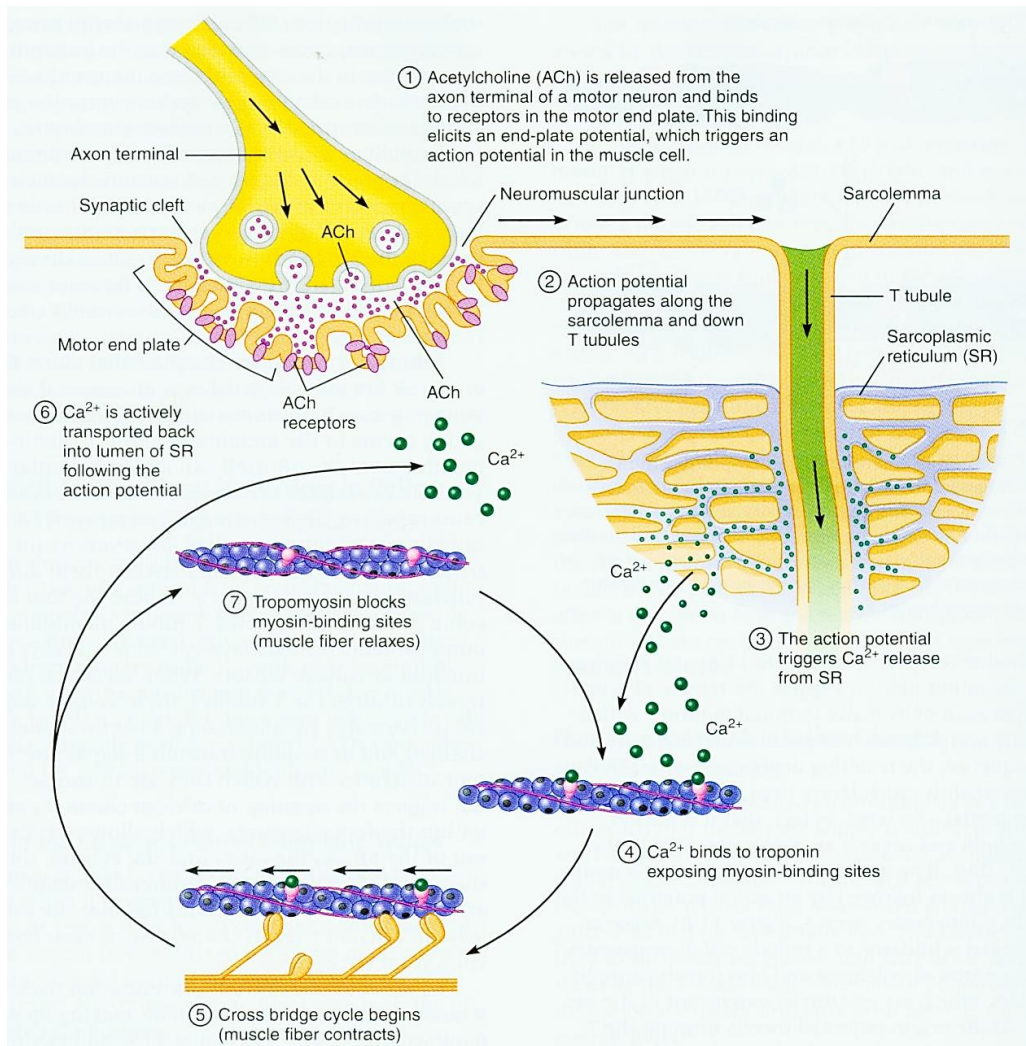
Aunque la ultraestructura y composición molecular de los sarcómeros es casi idéntica en las distintas miofibras, la existencia de isoformas para la mayoría de los componentes miofibrilares da lugar a la existencia de una heterogeneidad estructural y funcional inclusive dentro de un mismo músculo que se pone de manifiesto principalmente en la velocidad de acortamiento (isoformas de la cadena pesada de miosina) y en la sensibilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  (troponina y tropomiosina) (*para mayores detalles referirse a (Schiaffino & Reggiani, 2011)*).

En la interfaz entre el estímulo nervioso y la contracción muscular se encuentra el acoplamiento excito-contráctil (*AEC*) (**Figura 2**) cuyos elementos constitutivos son (1) la membrana plasmática o sarcolema con sus invaginaciones o túbulos T que se introducen profundamente en el citoplasma; (2) el canal de calcio voltaje-dependiente  $\text{Cav}1.1$  inserto en dichos túbulos y (3) el receptor de rianodina  $\text{RyR}$ , un canal de calcio a nivel del retículo sarcoplásmico (RS) (**Bannister, 2007**). Brevemente podemos señalar que el mecanismo de acople comienza con la liberación de acetilcolina por la terminal nerviosa a nivel de la placa neuromuscular que, mediante interacción con su receptor, desencadena la entrada de  $\text{Na}^{+2}$  en la miofibrila. El potencial de acción es conducido a lo largo del sarcolema y en los túbulos

T alcanza al canal de calcio tipo L ( $Ca_v1.1$ ) el cual transduce la señal eléctrica en mecánica abriendo su estructura del poro y permitiendo el paso de iones  $Ca^{+2}$  hacia el citosol. Al mismo tiempo,  $Ca_v1.1$  sufre un cambio conformacional que activa al receptor RyR mediante una interacción proteína-proteína, provocando su apertura y liberación masiva de  $Ca^{+2}$  desde el RS (Schneider & Chandler, 1973).

## 2) Breve reseña de las bases moleculares de la contracción muscular.

Los detalles moleculares del proceso de contracción muscular son extensos e intrincados y escapan al propósito de la revisión realizada en la presente Introducción. Se describirán entonces aquellos mecanismos y/o fenómenos relevantes para la presente tesis. El ME se contrae siguiendo la denominada teoría del desplazamiento de los filamentos propuesta en 1954 y confirmada un sinnúmero de veces en las décadas que siguieron. Brevemente, se produce una interacción cíclica entre las cabezas de la miosina con la actina, impulsada por la hidrólisis del ATP. Las fuerzas que se generan como resultado de dicha interacción son las que causan el deslizamiento de los filamentos de actina sobre los de miosina. Sin embargo, para que la miosina pueda acceder a su sitio de unión a la actina primero debe eliminarse la inhibición basal establecida por el complejo regulatorio tropomiosina-troponina. Aquí interviene el elemento fundamental en el proceso general de la contracción, el ion  $Ca^{+2}$ , que al interactuar con la subunidad C de la troponina genera un cambio conformacional del complejo que se desliza y libera el sitio activo sobre filamento de actina (Figura 2).



**Figura 2. Eventos durante el acoplamiento excito-contráctil.** (1) El aferente nervioso libera Acetilcolina en la placa neuromuscular la cual se une a su receptor y desencadena un potencial de acción en la fibra muscular; (2) El potencial de acción viaja por el sarcolema hasta llegar a los túbulos T; (3) El canal de calcio voltaje dependiente  $\text{Ca}_v1.1$  transduce la señal eléctrica en señal mecánica y provoca la apertura de los receptores RyR del retículo sarcoplásmico con la consiguiente salida de  $\text{Ca}^{+2}$ ; (4) El  $\text{Ca}^{+2}$  se une a la Troponina C exponiendo los sitios de unión a la miosina sobre los filamentos de actina; (5) Se desarrollan los puentes cruzados entre los filamentos de actina y miosina y el músculo se contrae; (6) La caída en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico provoca la relajación y el complejo troponina-tropomiosina vuelve a bloquear el sitio activo del filamento de actina.

### 3) Subtipos de fibras musculares

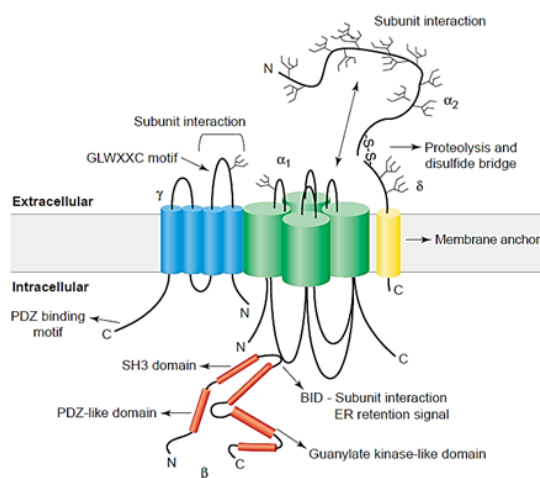
Los distintos tipos de miofibras se clasifican según el tipo de cadena pesada de miosina (isoformas de MHC) que componga sus filamentos gruesos. De acuerdo a la respuesta antigénica o histoquímica, se han descrito las siguientes isoformas en la mayoría

de los mamíferos: MHC tipo I (contracción lenta, metabolismo oxidativo) y MHC tipo II subtipos IIA, IIB, IIX (contracción rápida, predominantemente metabolismo glicolítico). Los músculos humanos carecen de isoforma IIB.

Una fibra muscular solo puede contener una isoforma pero un músculo dado puede estar compuesto de varias miofibras distintas. Sin embargo, es necesario señalar que el tipo de isoforma expresada en un momento dado puede variar en función de la inervación, el ejercicio, la sobrecarga mecánica, la inactividad, el estímulo hormonal y el envejecimiento. Esto altera el fenotipo de la miofibra en particular y el de todo el músculo en general (Schiaffino & Reggiani, 2011).

#### 4) Canal de Calcio Tipo L voltaje-dependiente (Ca<sub>v</sub>1.1)

Ca<sub>v</sub>1.1 es un canal de calcio de activación lenta ubicado en el sarcolema que funciona como un sensor de voltaje, canal para los iones Ca<sup>+2</sup> y transductor de señales en el proceso de acoplamiento excito-contráctil en el ME. Desde el punto de vista estructural está formado por una subunidad principal, α<sub>1s</sub>, que forma el poro transmembrana y las subunidades accesorias α<sub>2δ</sub>-1, β<sub>1a</sub> y γ<sub>1</sub> (Figura 3). Mientras que la función de la subunidad principal ha sido más estudiada y resulta entonces evidente, las subunidades accesorias cumplen funciones cuyos detalles no se conocen completamente. La subunidad β<sub>1a</sub> parece ser la más importante, adoptando una localización periférica e intracelular y regulando, entre otros, el tráfico de la subunidad α<sub>1s</sub> a la membrana plasmática y su recambio, la frecuencia de apertura del poro, la interacción Ca<sub>v</sub>1.1-RyR, etc. (para mayor detalles ver la Introducción correspondiente al Cap. I de la presente tesis).



**Figura 3. Topología de membrana descrita para el canal de calcio voltaje-dependiente Ca<sub>v</sub>1.1.** El esquema muestra la disposición de las subunidades del canal en la membrana plasmática, las interacciones entre las mismas y los dominios relevantes desde el punto de vista funcional.

## 5) Envejecimiento y sarcopenia

La sarcopenia fue definida por el European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) como un *“síndrome caracterizado por la pérdida progresiva, generalizada y asociada a la edad de la masa y fuerza muscular, con el consiguiente riesgo de efectos adversos como discapacidad física, pobre calidad de vida y muerte”*. Frente a la necesidad de contar con un criterio diagnóstico que sirviera a fines clínicos y de investigación, la International Working Group on Sarcopenia (IWGS) propuso en 2009 que la sarcopenia fuera diagnosticada como la combinación entre una masa muscular corporal reducida y un pobre desempeño físico (**Fielding et al., 2011**). En 2014, ambas sociedades publicaron en conjunto una revisión sistemática basada en reportes de sarcopenia en poblaciones claramente definidas. Allí, se muestra que la prevalencia de sarcopenia en individuos  $\geq 50$  años de edad presenta variaciones regionales y por grupos etarios siendo 1-29% entre los individuos que residen en la comunidad general, 14-33% en poblaciones recluidas en centros de asistencia a largo plazo como asilos y residencias geriátricas y un 10% en las poblaciones hospitalizadas de manera aguda (**Cruz-Jentoft et al., 2014**).

Bajo condiciones fisiológicas, la homeostasis del músculo esquelético se mantiene por un delicado balance entre la fusión de células precursoras para dar lugar a miofibras maduras, la hipertrofia y el catabolismo proteico. Este balance es coordinado por el Sistema Nervioso Central, el sistema endócrino y el sistema inmune y se ve afectado positiva o negativamente por factores nutricionales y por la actividad física. Durante el envejecimiento este balance se altera y comienza a desarrollarse la sarcopenia que genera además consecuencias sistémicas, más allá del propio tejido. Así, la pérdida de masa y fuerza muscular que tiene lugar durante el envejecimiento se constituye como un factor de riesgo independiente para la dificultad en ejecutar actividades cotidianas básicas, la osteoporosis, las caídas, la duración de las hospitalizaciones y el número de re-admisiones como así también para la mortalidad por todas las causas (**Alley et al., 2010; Cruz-Jentoft et al., 2014**).

Diversos estudios de cohortes demostraron que la pérdida de fuerza muscular asociada a la edad es 2 a 5 veces más rápida que la pérdida de masa muscular (**Goodpaster et al., 2006**) y que este fenómeno se correlaciona fuertemente con el riesgo de discapacidad y muerte (**Newman et al., 2006**). Así, aunque la masa de un músculo dado es un

determinante importante de la fuerza que este puede desarrollar durante la contracción, queda demostrado que su pérdida no permite explicar completamente el detrimento de la fuerza muscular conforme el individuo envejece (**Lynch, Hinkle, & Faulkner, 1999; Rolland, Perry, Patrick, Banks, & Morley, 2007**). Debe haber entonces otros factores locales y/o sistémicos con un rol activo en el desarrollo de la sarcopenia.

Se ha propuesto que durante el envejecimiento el sistema de mecano-transducción del músculo esquelético se vuelve cada vez menos sensible a medida que la miofibra se vuelve menos responsiva debido al aumento de la cantidad y rigidez del tejido conectivo dentro de dicho tejido (**Goldspink, 2012**). Otro factor que parece contribuir al desarrollo de la sarcopenia es la reducción en los niveles circulantes de hormonas y/o factores tróficos que modulan la expresión de genes involucrados en la reparación, regeneración y mantenimiento del aparato contráctil, principalmente aquellos derivados del eje endócrino hormona de crecimiento (GH)/IGF-1 (**Goldspink & Harridge, 2004**). La principal población de células blanco para estos factores tróficos son las células satélite residentes en el musculo esquelético post mitótico y asociadas a las miofibras maduras. Sobre ellas recae la actividad restauradora del tejido a continuación de la injuria a pesar de haberse identificado otras poblaciones de células con capacidad miogénica (**Pallafacchina, Blaauw, & Schiaffino, 2013**). Así, aunque intrínsecamente viable, la capacidad adaptativa del musculo a la injuria se encuentra disminuida durante el envejecimiento. El componente neural también se encuentra comprometido en el musculo sarcopénico. Numerosos estudios sobre atrofia muscular asociada a la edad señalan una considerable pérdida de motoneuronas en el asta anterior de la médula y de placas neuromusculares a nivel de las miofibras tanto en condiciones basales como en situaciones donde la re-inervación de fibras es requerida (**M. J. Campbell, McComas, & Petito, 1973**).

El grupo de trabajo del Dr. Delbono ha trabajado en dilucidar como el envejecimiento afecta a nivel molecular la eficiencia del acoplamiento excito-contráctil. Alteraciones en el acoplamiento entre la despolarización de membrana y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico (RS) disminuyen la capacidad generadora de fuerza en ratones y humanos gerontes (**Z.-M. Wang, Messi, & Delbono, 2000**). Uno de los mecanismos moleculares involucrados es la reducción de la subunidad  $\alpha$  del canal de calcio voltaje dependiente, Cav1.1, demostrado tanto por la menor entrada de calcio hacia el citoplasma luego de la despolarización (**Delbono & Chu, 1995; Renganathan, Messi, & Delbono, 1997**) como



por la menor presencia de copias de la subunidad en el sarcolema (**Renganathan, Messi, & Delbono, 1998**). Su presencia en el sarcolema es esencial para el acoplamiento éxito-contráctil al interactuar con el receptor de rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico y permitir la salida de calcio hacia el citosol.

Otros investigadores han demostrado en un modelo de miofibra aislada y permeabilizada (*skinned single fibers*) que la fuerza específica también se reduce durante el envejecimiento (**Larsson, Li, & Frontera, 1997; Thompson & Brown, 1999**). Esto indica que el aparato contráctil se encuentra alterado de manera independiente y que pueden subyacer entonces allí otras bases moleculares que contribuyan a la sarcopenia. Conocer en detalle estos fenómenos permitiría desarrollar estrategias terapéuticas que no solo incrementen la masa muscular sino que mejoren la eficiencia del proceso contráctil per se.

## **6) Sistemas proteolíticos en el Músculo Esquelético – Rol de las calpaínas.**

Siendo el músculo esquelético un tejido altamente proteico, el catabolismo de estas biomoléculas en un proceso importante, altamente regulado y sensible al estado nutricional, el ejercicio y las hormonas circulantes (**Jackman & Kandarian, 2004**).

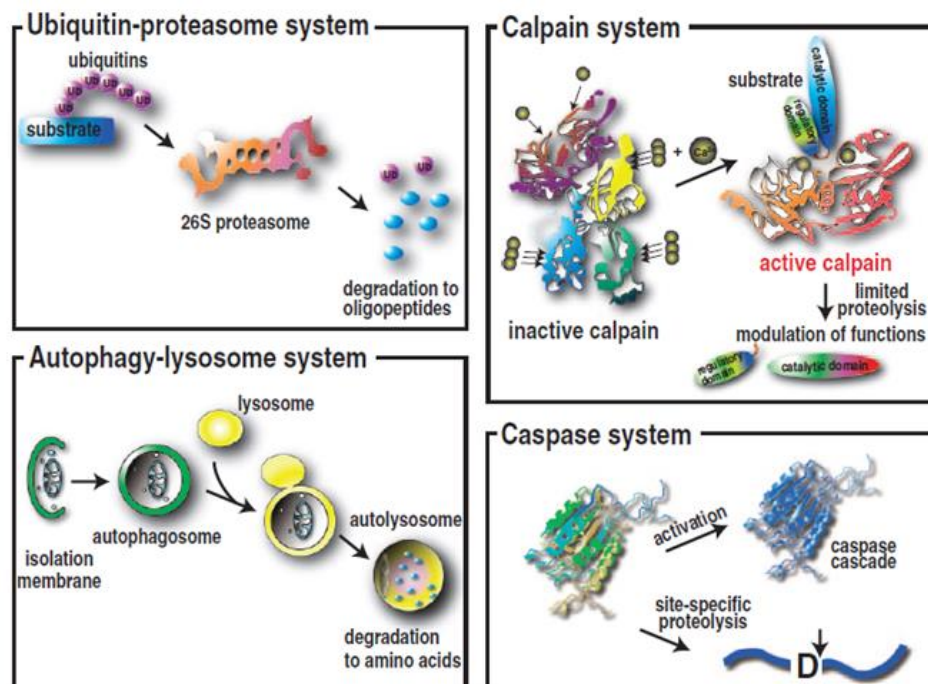
Así, la proteólisis en este tejido se lleva a cabo mediante distintos mecanismos o sistemas que actúan concertadamente en situaciones fisiológicas (**Figura 4**). Por ejemplo, en el músculo sano, el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) es el principal mecanismo por el cual se recambian los fragmentos de acto-miosina que fueron generados inicialmente por la acción del sistema de calpaínas.

La autofagia (o sistema autofágico-lisosomal) es un mecanismo homeostático altamente conservado por el cual grandes complejos proteicos y organelas citoplasmáticas son degradadas. Este sistema proteolítico es especialmente sensible a la deprivación de aminoácidos de la dieta y al ayuno aún de corta duración y juega un rol importante en la atrofia muscular (**M. Sandri, 2013**).

Las calpaínas son una familia de endopeptidasas dependientes de calcio. El músculo esquelético contiene isoformas ubicuas como Calpaína-1 (tipo  $\mu$ ) y Calpaína-2 (tipo m) e isoformas tejido-específicas como Calpaína-3 (**Sorimachi, Hata, & Ono, 2011**). Calpaína-1 es la más abundante y media la proteólisis regulada de varias proteínas celulares,

incluyendo algunas del citoesqueleto en el contexto de una función “remodeladora” (R. L. Campbell & Davies, 2012). Su sobreactivación causa daño celular irreversible y ha sido demostrado que contribuye a patologías como isquemia cerebral y cardíaca, enfermedad de Alzheimer, artritis, cataratas, hipertrofia cardíaca, alteraciones de la contractilidad del miocardio, entre otras (M. S. Lee et al., 2000; Sorimachi & Ono, 2012; K. K. Wang & Yuen, 1994)

En el músculo esquelético el sistema proteolítico de calpaínas pareciera actuar sobre un sinnúmero de sustratos, degradándolos o modificando su función biológica (Sorimachi & Ono, 2012). El mismo puede ser activado por las microinjurias que se dan a lo largo de la vida del individuo a consecuencia de la actividad física cotidiana. Esto cobra especial relevancia en edades avanzadas donde hay una mayor susceptibilidad a este fenómeno, una menor capacidad de respuesta compensadora y una homeostasis del calcio intracelular alterada (Faulkner, Brooks, & Opitck, 1993; Salazar, Michele, & Brooks, 2010).



**Figura 4. Principales sistemas proteolíticos intracelulares.** (1) El sistema Ubiquitina-proteosoma degrada y elimina sustratos proteicos específicos que han sido previamente marcados/etiquetados con varias moléculas de ubiquitinas; (2) El sistema autofágico-lisosomal actúa principalmente degradando componentes celulares no-específicos, incluyendo proteínas y organelas; (3) El sistema de calpaínas es principalmente un sistema proteolítico de regulación y no de degradación, modulando o modificando la actividad, especificidad, vida media y localización de los sustratos sobre los que actúa; (4) El sistema de Caspasas tiene similitudes funcionales con las calpaínas pero actúan principalmente en el contexto de la apoptosis.

## PARTE II - OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Conocer en detalle las bases moleculares que subyacen al fenómeno de la sarcopenia permitiría desarrollar estrategias terapéuticas que no solo incrementen la masa muscular sino que mejoren la eficiencia del proceso contráctil per se.

Se ha reportado que el envejecimiento afecta negativamente la eficiencia del proceso de activación-contracción. Alteraciones en el acoplamiento entre la despolarización de membrana y la liberación de  $Ca^{+2}$  desde el retículo sarcoplásmico (RS) disminuyen la capacidad generadora de fuerza en ratones y humanos gerontes, proceso conocido como desacoplamiento excito-contráctil. Uno de los mecanismos moleculares involucrados es la reducción de la subunidad  $\alpha 1$  del canal de calcio voltaje-dependiente, Cav1.1.

Estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación señalan que la Troponina T3 (TnT3), una proteína reguladora del proceso contráctil, experimenta una fragmentación regulada que se incrementa con la edad y que cumple un rol deletéreo sobre la miofibra. Al parecer esta fragmentación estaría mediada por el sistema de calpaínas.

La relación causal entre la fragmentación de TnT3 y la expresión de Cav1.1 en el músculo esquelético sarcopénico no había sido estudiada hasta ahora.

Así, nos propusimos como **objetivo general** estudiar la interacción entre Cav1.1, Troponina T3 y calpaínas como determinantes de la fuerza de contracción en el músculo esquelético sarcopénico de los ratones C57BL/6.

En el **primera parte** de nuestro proyecto de investigación nos propusimos los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) investigar en el músculo esquelético de ratones C57BL/6 de 23 meses de edad si existe una asociación causal entre la fragmentación de TnT, los niveles de Cav1.1 observados y la declinación de la fuerza de contracción.
- 2) determinar si el bloqueo del sistema de calpaínas con el inhibidor BDA-410 podría revertir dichos fenómenos deletéreos.

En la **segunda parte** de nuestro proyecto de investigación, los **objetivos específicos** propuestos fueron como a continuación:

- 3) analizar los mecanismos subyacentes a la pérdida de peso observada en los ratones C57BL/6 de 23 meses de edad luego de la administración del inhibidor de calpaínas BDA-410;
- 4) establecer si existe una asociación causal entre este fenómeno y la fuerza de contracción en el músculo sarcopénico.

## **PARTE III – DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **CAPITULO I.**

#### **Efecto De La Inhibición Del Sistema De Calpaínas Sobre La Generación De Fuerza Muscular En Ratones Gerontes.**

## I.A INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS

Bajo condiciones fisiológicas, la homeostasis del músculo esquelético se mantiene por un delicado balance entre la fusión de células precursoras que dan lugar a miofibras maduras, la hipertrofia y el catabolismo proteico. Este balance es coordinado por el Sistema Nervioso Central, el sistema endócrino y el sistema inmune y se ve afectado positiva o negativamente por factores nutricionales y por la actividad física. Durante el envejecimiento el estado homeostático se altera y comienza la pérdida de masa y fuerza muscular que genera además consecuencias sistémicas. Así, la sarcopenia constituye un factor de riesgo independiente para la dificultad en ejecutar actividades cotidianas básicas, la osteoporosis, las caídas, la duración de las hospitalizaciones y el número de re-admisiones como así también para la mortalidad por todas las causas (**Alley et al., 2010; Cruz-Jentoft et al., 2014**).

Diversos estudios de cohortes demostraron que la pérdida de fuerza muscular asociada a la edad es 2 a 5 veces más rápida que la pérdida de masa muscular (**Goodpaster et al., 2006**) y que este fenómeno se correlaciona fuertemente con el riesgo de discapacidad y muerte (**Newman et al., 2006**). Así, aunque la masa de un músculo dado es un determinante importante de la fuerza que este puede desarrollar durante la contracción, queda demostrado que su disminución no permite explicar completamente la caída de la fuerza muscular conforme el individuo envejece (**Lynch et al., 1999; Rolland et al., 2007**). Deben existir entonces otros factores locales y/o sistémicos con un rol activo en el desarrollo de la sarcopenia.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que el envejecimiento afecta negativamente la eficiencia del proceso de activación-contracción (**Delbono, 2011**). Alteraciones en el acoplamiento entre la despolarización de membrana y la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el retículo sarcoplásmico (RS) disminuyen la capacidad generadora de fuerza en ratones y humanos gerontes, proceso conocido como *desacoplamiento excito-contráctil (DEC)* (**Z.-M. Wang et al., 2000**). Uno de los mecanismos moleculares involucrados es la reducción de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio voltaje-dependiente,  $\text{Ca}_v1.1$  (**Renganathan, Messi, & Delbono, 1997**). Su presencia en el sarcolema es esencial para el acoplamiento excito-contráctil al interactuar con el receptor de rianodina (RyR) del RS y permitir la salida de  $\text{Ca}^{+2}$  hacia el citosol.

Por otra parte, investigadores han demostrado en un modelo de miofibra aislada y permeabilizada (*skinned single fibers*) donde el citoplasma queda expuesto al medio extracelular sin mediación alguna del sarcolema, que la fuerza específica también se reduce durante el envejecimiento (Larsson et al., 1997; Thompson & Brown, 1999). Esto indica que el aparato contráctil se encuentra alterado de manera independiente al desacoplamiento excito-contráctil.

En el citoplasma de la miofibra o miotúbulo, la Troponina T (TnT) es reconocida como un elemento esencial en la interacción entre el complejo de Troponinas (T, C e I) y la proteína Tropomiosina, la que a su vez es necesaria para la contracción dependiente de calcio al regular la interacción entre los filamento de actina y miosina (**Jin, Zhang, & Bautista, 2008**). Previamente nuestro grupo reportó un rol no tradicional para la isoforma de TnT expresada en músculos de contracción rápida, la TnT3. Específicamente, se determinó cómo la proteína de longitud completa o *full length* (TnT-FL) y sus fragmentos Carboxilo- (TnT-CT) y Amino-terminal (TnT-NT) pueden detectarse tanto en la fracción citosólica como en la fracción nuclear de miofibras aisladas de músculo esquelético murino. De mayor relevancia aún, los mionúcleos de los músculos de ratones gerontes presentaban una proporción menor de la forma FL acompañada de un aumento significativo de la fracción TnT-CT en comparación con su contraparte derivada de animales jóvenes. Estas variaciones cuali-cuantitativas de proteínas reguladoras de la contracción muscular estaban asociadas a una marcada disfunción nuclear y niveles reducidos de Cav1.1 (**Tan Zhang, Alexander Birbrair, & Osvaldo Delbono, 2013; Tan Zhang, Birbrair, Wang, et al., 2013**). La relación causal entre la fragmentación de TnT3 y la expresión de Cav1.1 en el músculo esquelético sarcopénico no había sido estudiada hasta ahora.

Las calpaínas son una familia de endopeptidasas dependientes de Ca<sup>+2</sup>. El músculo esquelético contiene isoformas ubicuas como Calpaína-1 (tipo  $\mu$ ) y Calpaína-2 (tipo  $m$ ) e isoformas tejido-específicas como Calpaína-3. Calpaína-1 es la más abundante y media la proteólisis regulada de varios sustratos celulares, incluyendo proteínas del citoesqueleto en el contexto de una función “remodeladora” y/o reguladora de actividad (**R. L. Campbell & Davies, 2012**). Su sobre-activación causa daño celular irreversible y ha sido demostrado que contribuye a patologías como isquemia cerebral y cardíaca, enfermedad de Alzheimer, artritis y cataratas (**M. S. Lee et al., 2000; K. K. Wang & Yuen, 1994**).

En el músculo esquelético, el sistema proteolítico de calpaínas puede ser activado por las microinjurias que se dan a lo largo de la vida del individuo a consecuencia de la actividad física cotidiana. Esto cobra especial relevancia en edades avanzadas donde hay una mayor susceptibilidad a este fenómeno, una menor capacidad de respuesta compensadora y una homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular alterada (Faulkner et al., 1993; Salazar et al., 2010). Es necesario recordar aquí que la proteólisis mediada por calpaínas juega un rol fundamental en la atrofia muscular inducida por un estado septicémico. Durante el mismo los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular aumentan significativamente, provocando la activación masiva de las calpaínas que a su vez modulan positivamente la función del proteosoma, clivan proteínas miofibrilares y regulan directa e indirectamente la expresión de numerosos genes para generar un estado pro-catabólico (Smith, Lecker, & Hasselgren, 2008).

Conocer en detalle las bases moleculares que subyacen al fenómeno de la sarcopenia permitiría desarrollar estrategias terapéuticas que no solo incrementen la masa muscular sino que mejoren la eficiencia del proceso contráctil per se. Estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación (Dr. Tan Zhang, WFUSM) señalan que la fragmentación que experimenta la TnT3, y que se acentúa a medida que el individuo envejece, estaría mediada por calpaínas.

*Así, nos propusimos (1) investigar en el músculo esquelético de ratones C57BL/6 de 23 meses de edad si existía una asociación causal entre la fragmentación de TnT, los niveles de  $\text{Ca}_v1.1$  observados y la declinación de la fuerza de contracción y (2) determinar si el bloqueo o inhibición del sistema de calpaínas podría revertir dichos fenómenos deletéreos.*



## **I.B RESULTADOS**

Tal como se indica en el apartado metodológico que acompaña a este capítulo (**figura I.D.1**), dos grupos o cohortes de ratones C57BL/6 hembra de 23 meses de edad fueron tratados diariamente y durante 21 días con una solución vehículo (Tween 80<sup>®</sup> al 1% en NaCl 0.09%) o una suspensión del inhibidor de calpaínas BDA-410 (disuelto en vehículo) constituyendo así el grupo control y el grupo experimental, respectivamente. La administración se realizó por vía oral a una dosis de 30 mg/kg/día en un volumen equivalente a 10 ml/kg de peso del animal. Una vez finalizada la intervención se procedió a analizar una serie de variables relacionadas con la fuerza muscular y sus determinantes moleculares. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

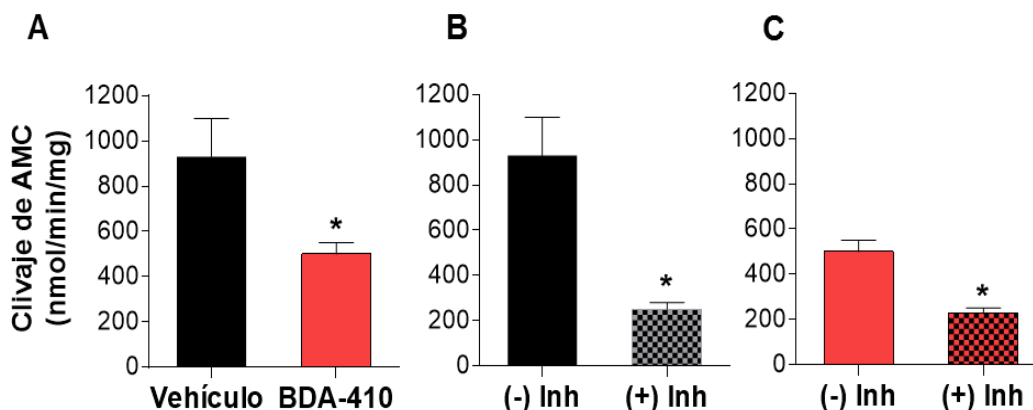
### ***I.B.1. La administración de BDA-410 inhibe la actividad proteolítica endógena de las calpaínas en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 de 23 meses de edad.***

Tal como se mencionara en la introducción del presente capítulo, existe evidencia que señala que la fragmentación regulada de Troponina T3 en el músculo esquelético podría contribuir a las bases moleculares de la sarcopenia mediada por el sistema de las calpaínas (**T. Zhang, A. Birbrair, & O. Delbono, 2013; T. Zhang, Birbrair, Wang, et al., 2013**).

Así, nos preguntamos si BDA-410, un potente y selectivo inhibidor de estas cisteín-proteasas, podría ejercer un rol protector contra los efectos deletéreos del envejecimiento normal en el músculo esquelético. Como medida inicial fue necesario determinar el nivel de inhibición alcanzado luego de la administración diaria de BDA-410 en ratones C57BL/6. En la **figura I.B.1A** se observa que luego de 21 días de administración oral de BDA-410, la actividad proteolítica mediada por calpaínas en los homogenatos de músculos Isquiotibiales se redujo un 47% respecto a la administración de solución vehículo ( $p < 0.05$ ) tal como lo señala el clivaje in vitro de AMC ( $930 \pm 170$  mmol/min/mg para grupo control vs.  $500 \pm 50$  mmol/ min/mg para grupo BDA-410).

Como parte del ensayo se realizaron también mediciones en ausencia y presencia de un inhibidor “patrón” de calpaínas (carbобензохи-валинил-фенилаланина o inhibidor III) para determinar si las moléculas de estas proteasas presentes en ambos homogenatos, control y BDA-410, se encontraban activas y factibles de inhibición. Las **figuras I.B.1B y 1C** muestran que la capacidad de clivaje del AMC en presencia del inhibidor III se redujo sustancialmente tanto en los músculos tratados con solución vehículo y con BDA-410 pero

sin mostrar diferencias entre ambos grupos. Analizados en conjunto estos resultados indican que BDA-410 generaría un potente bloqueo de la actividad endógena de las calpaínas y que la actividad enzimática remanente podría ser inhibida in vitro.



**Figura I.B.1. Efecto de la administración de BDA-410 sobre la actividad de calpaínas en músculo esquelético murino.** (A) La administración sistémica de BDA-410 redujo la actividad proteolítica de calpaínas en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 en un 47% más que la administración de solución vehículo. El ensayo inhibitorio con carbobenzoxi-valinil-fenilalanina mostró una reducción de la actividad de las calpaínas presentes en las muestras de los animales del grupo control (B) como del grupo experimental (C) del 73 % y 54 % respectivamente. \* $p < 0.05$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=3$  para cada grupo.

### ***I.B.2. La inhibición de calpaínas incrementa la fuerza muscular ex vivo en los ratones C57BL/6 gerontes.***

Para determinar el efecto de la inhibición del sistema de calpaínas sobre la fuerza muscular decidimos inicialmente analizar la performance ex vivo del músculo Soleo. Este posee una composición mixta de fibras rápidas y lentas lo que permite evaluar diversos determinantes moleculares de la producción de fuerza de un músculo.

Luego de la administración de BDA-410, en los músculos Soleo se observó un aumento significativo en la producción de fuerza absoluta durante la mayoría de las frecuencias de estimulación sub-máxima y máxima en comparación con los músculos de animales tratados con vehículo (**figura I.B.2A y 2B**). Los valores en Newton (N) se visualizan en la Tabla I.B.1.

Frecuencia (Hz)	Grupo Vehículo (N)	Grupo BDA-410 (N)	Incremento Relativo (%)	<i>p</i>
1	0.062 ± 0.0013	0.079 ± 0.0028	128.3	<0.001
5	0.072 ± 0.0029	0.091 ± 0.0047	126.5	0.002
10	0.118 ± 0.0047	0.148 ± 0.0055	125.8	0.002
20	0.188 ± 0.0080	0.223 ± 0.0080	118.7	0.011
50	0.227 ± 0.012	0.254 ± 0.009	111.6	0.108
100	0.238 ± 0.0130	0.275 ± 0.0111	115.7	0.054
150	0.238 ± 0.0129	0.275 ± 0.0110	115.7	0.052

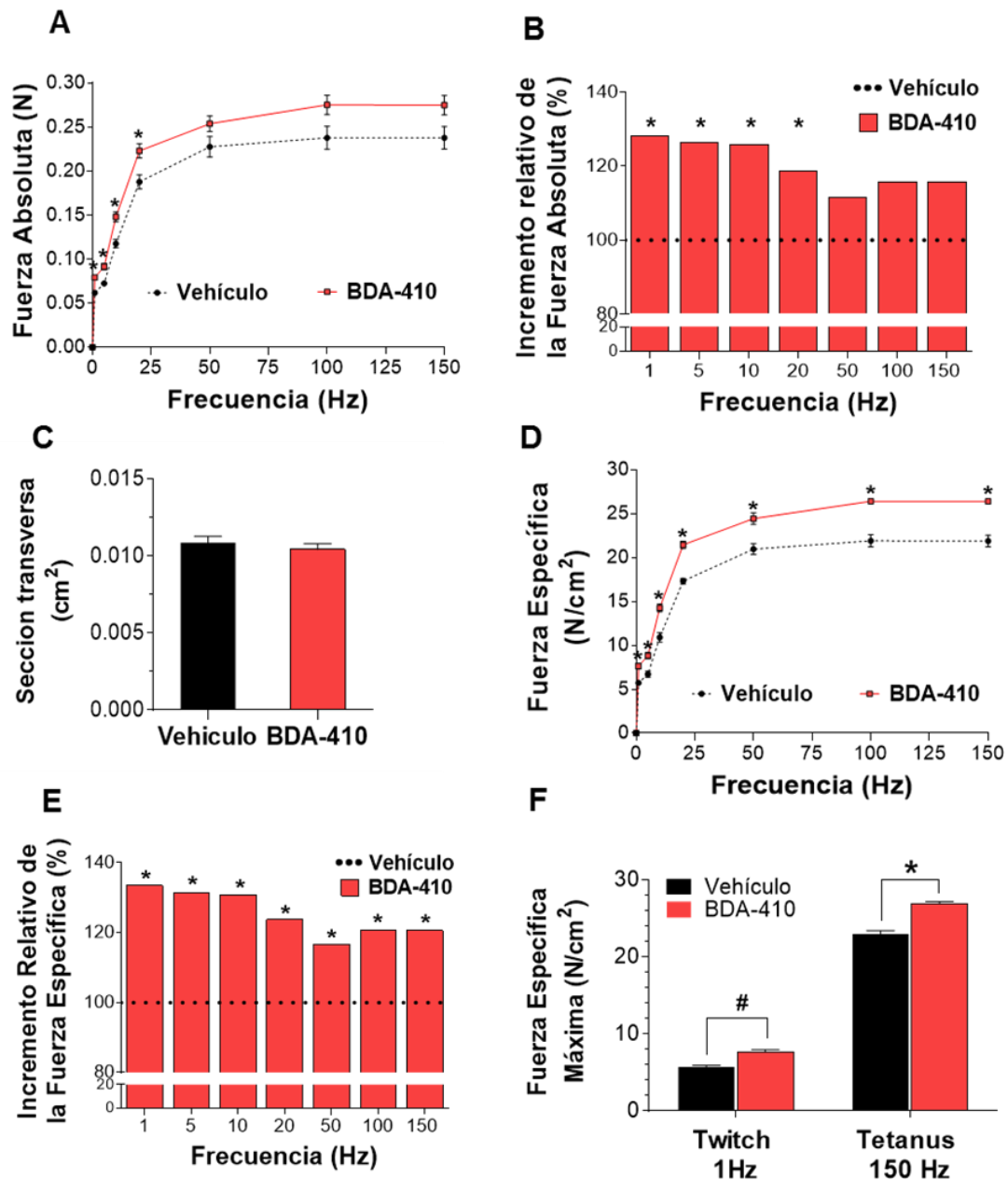
**Tabla I.B.1. Fuerza de contracción absoluta desarrollada por el músculo Soleo en individuos tratados con solución vehículo o con BDA-410.** Los resultados se expresan como la media ± EEM; n=6 para cada grupo. Hz= Hertz; N= Newton.

Dado que la producción de fuerza se correlaciona positivamente con el número y diámetro de las fibras musculares que lo componen decidimos evaluar la sección transversa de los mismos. En la **figura I.B.2C** se observa que no hay diferencia significativa en el tamaño de los músculos de ambos grupos ( $0.011 \pm 0.00042 \text{ cm}^2$  para grupo control y  $0.010 \pm 0.00037 \text{ cm}^2$  para el grupo experimental) sugiriendo entonces que el aumento registrado en la fuerza absoluta no se debería a un aumento en el contenido de las unidades proteicas contráctiles.

A continuación se calculó la fuerza de contracción específica como la razón entre la fuerza absoluta y el valor de la sección transversa de cada músculo con el fin de obtener una medida comparable entre ambos grupos experimentales. Como se observa en las **figuras I.B.2D y 2E**, la administración de BDA-410 aumentó de manera significativa la tensión específica de contracción para cada una de las frecuencias de estimulación ensayadas. Los valores en Newton/cm<sup>2</sup> (N/cm<sup>2</sup>) se exponen en la Tabla I.B.2.

Frecuencia (Hz)	Grupo Vehículo (N/cm <sup>2</sup> )	Grupo BDA-410 (N/cm <sup>2</sup> )	Incremento Relativo (%)	<i>p</i>
1	5.720 ± 0.209	7.637 ± 0.314	133.5	<0.001
5	6.711 ± 0.344	8.825 ± 0.346	131.5	0.001
10	10.9 ± 0.529	14.252 ± 0.441	130.8	<0.001
20	17.314 ± 0.325	21.436 ± 0.411	123.8	<0.001
50	20.952 ± 0.615	24.426 ± 0.631	116.6	0.003
100	21.896 ± 0.681	26.413 ± 0.261	120.6	<0.001
150	21.881 ± 0.655	26.391 ± 0.272	120.6	<0.001

**Tabla I.B.2. Fuerza de contracción específica desarrollada por el músculo Soleo en individuos tratados con solución vehículo o con BDA-410.** Los resultados se expresan como la media ± EEM; n=6 para cada grupo. Hz= Hertz; N/cm<sup>2</sup>= Newton/centímetro cuadrado.



**Figura I.B.2. Efecto de la administración de BDA-410 sobre la fuerza de contracción muscular isométrica ex vivo.** (A) Fuerza absoluta en Newtons (N) producida ex vivo por el músculo Soleo de ratones gerontes en respuesta a la estimulación supra-máxima a 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 150 Hz para ambos grupos, control y experimental con BDA-410. (B) Incremento relativo de la fuerza absoluta de contracción en el grupo BDA-410 comparado con el grupo control. (C) Evaluación de la sección transversa de los músculos Soleo de ambos grupos luego de finalizada la intervención. (D) Fuerza específica de contracción calculada como la relación entre la fuerza absoluta y la sección transversa. (E) Incremento relativo de la fuerza específica en el grupo BDA-410 comparado con los valores del grupo control. (F) Comparación entre la contracción simple (twitch) y la contracción tetánica (tetanus) entre ambos grupos. En (A) y (B) \* $p < 0.01$ . En (D) y (E): \* $p \leq 0.003$ . En (F) # $p$  y \* $p < 0.001$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $n=6$  para cada grupo.

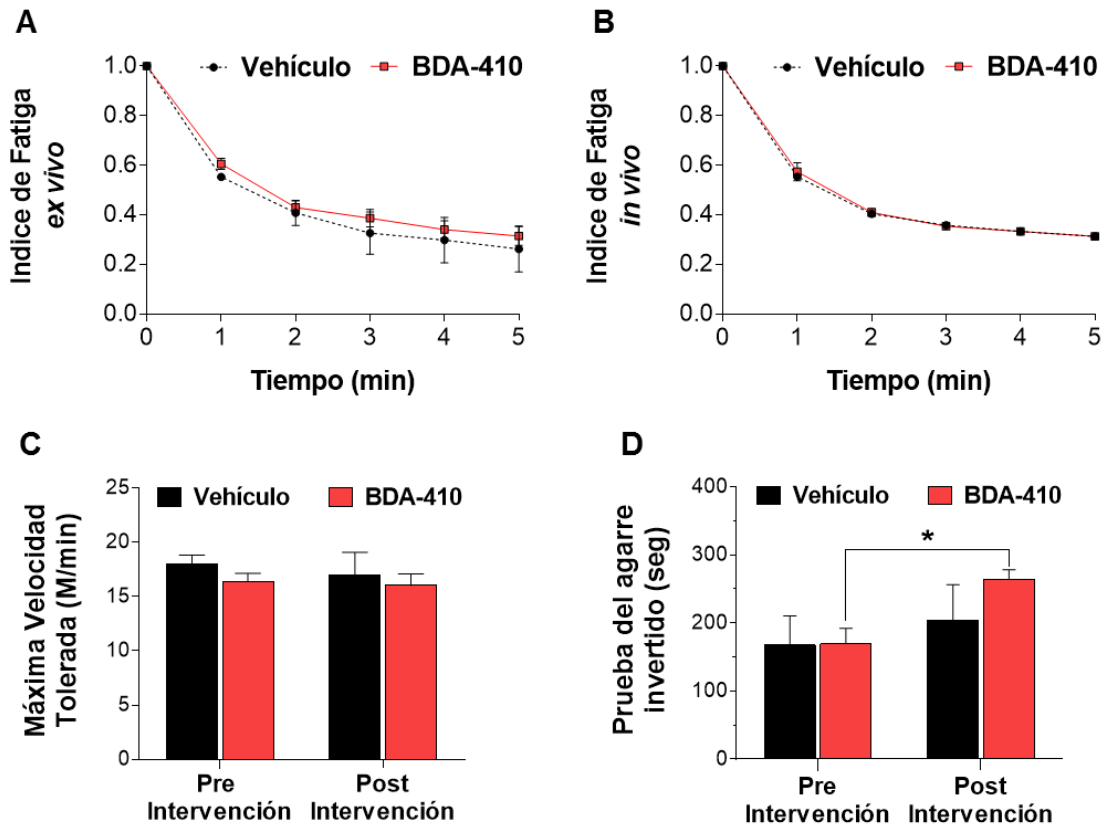
La **figura I.B.2F** resume los valores alcanzados por los músculos de cada grupo durante la contracción simple (twitch) y la contracción tetánica (tetanus) para permitir una mejor comparación entre estas variables representativas del desempeño del músculo Soleo. Así, para los individuos tratados con BDA-410 el valor del twitch mostró un aumento del 33.5 % y el tetanus un aumento del 20.6 % respecto del grupo control tratado con solución vehículo.

### ***I.B.3. La inhibición de calpaínas no modifica la resistencia a la fatiga muscular ex vivo e in vivo en los ratones C57BL/6 gerontes.***

A fin de evaluar si el aumento en la fuerza de contracción observado luego de la inhibición de calpaínas se acompañaba de cambios en el perfil de fatigabilidad muscular se procedió a medir dicha variable *ex vivo* e *in vivo* como se detalla en el apartado metodológico.

En la **figura I.B.3A** se observa que luego de la administración de BDA-410 el índice de fatiga *ex vivo* (razón entre la máxima fuerza desarrollada a cada minuto, durante 5 minutos y la fuerza inicial a tiempo cero) del músculo Soleo se mantuvo casi invariable, no habiendo diferencias significativas con el grupo control.

La fatigabilidad *in vivo* pre y post intervención con vehículo o BDA-410 se determinó de manera pasiva en el músculo Triceps Surae (Gastrocnemio y Soleo) registrando la producción de fuerza generada durante la flexión plantar del pie del ratón a raíz de un estímulo eléctrico (**figura I.B.3B**). De manera activa, la fatigabilidad se evaluó como la velocidad máxima tolerada por los individuos en la cinta caminadora (**figura I.B.3C**) y el tiempo máximo de agarre en la prueba de la pantalla invertida de Kondziela (**figura I.B.3D**). Solo esta última determinación mostró una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p=0.045$ ) pero, tal como se discute más adelante, la misma depende de variables complejas que se entrelazan como la fuerza, fatiga muscular y el peso del animal.



**Figura I.B.3. Efectos de la administración de BDA-410 sobre la fatiga muscular y la resistencia al ejercicio.** (A) Análisis de la fatiga muscular ex vivo en músculo Soleo de ratones C57BL/6 gerontes tratados con vehículo o BDA-410. El índice de fatiga representa la relación entre la máxima fuerza desarrollada a cada minuto, durante 5 minutos y la fuerza inicial. (B) Análisis de la fatiga muscular in vivo en el músculo tríceps surae de ambos grupos experimentales. (C) Durante un protocolo de actividad forzada se registró la máxima velocidad (metros/minuto) tolerada por cada individuo antes y después de la intervención con vehículo o BDA-410. (D) Evaluación de la fuerza de agarre y resistencia a la caída (segundos) estando el individuo en posición horizontal e invertida (test de Kondziela). En (A)  $n=3$  para grupo control y  $n=4$  para BDA-410. En (B)  $n=4$  para cada grupo. En (C) y (D)  $n=4$  para grupo control y  $n=5$  para BDA-410; \*  $p= 0.045$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

***I.B.4. La inhibición de calpaínas no modifica el contenido total de las principales proteínas motoras/contráctiles del músculo esquelético ni el perfil miofibrilar en los ratones C57BL/6 gerontes.***

Como se describiera en la introducción de la presente Tesis, uno de los determinantes de la fuerza o tensión de un músculo durante la contracción es la cantidad y calidad de las proteínas contráctiles que lo componen.

A fin de establecer si el aumento en la tensión contráctil registrada en los ratones gerontes (luego de la administración de BDA-410) podría responder a este fenómeno, decidimos cuantificar los niveles totales de Actina, Miosina, Troponina T, Troponina I y Titina. A continuación se describen los resultados obtenidos en colaboración con los Dres. J-P Jing (Wayne State University School of Medicine, USA) y Tan Zhang (Laboratorio del Dr. Delbono, WFUSM, USA).

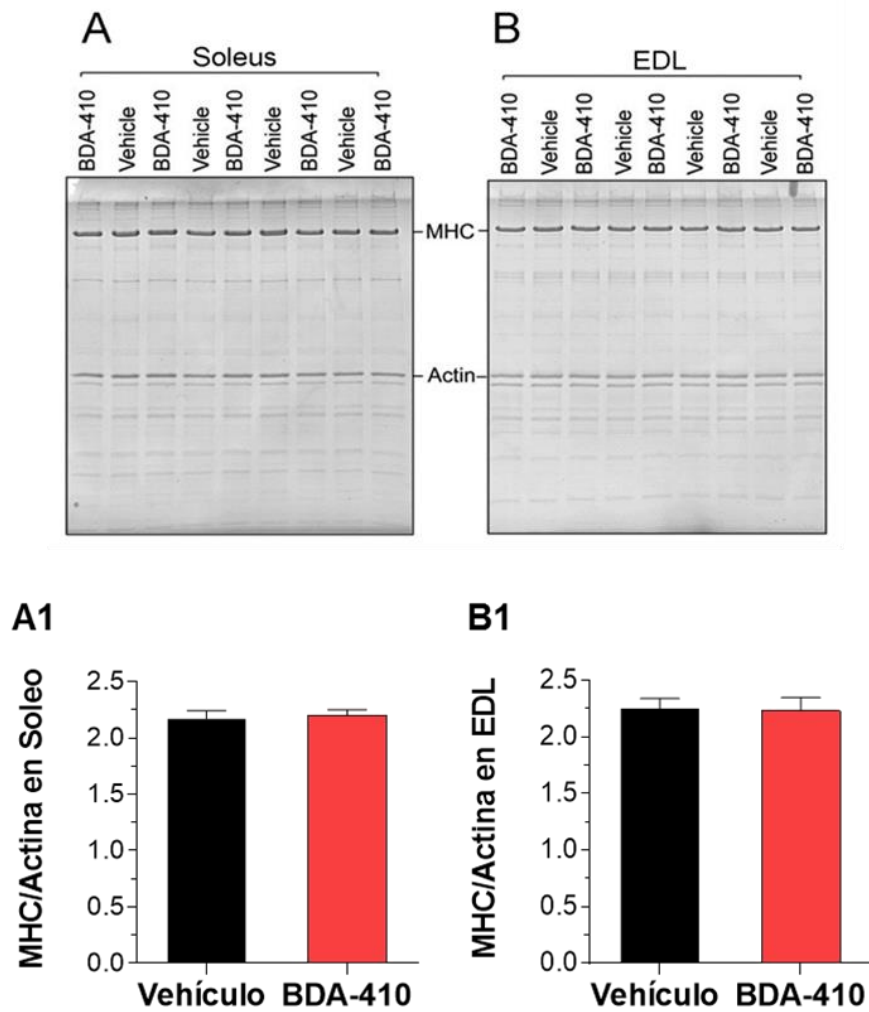
En la **figura I.B.4** se observa que los niveles absolutos y relativos de miosina y actina tanto en músculos de fibras rápidas (EDL) como mixtos a predominio lento (Soleo) permanecieron invariables luego de la administración de BDA-410. Resultados similares se obtuvieron respecto a los niveles de Titina (**figura I.B.5 A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>**).

También se analizaron las distintas isoformas (IIa, IIx, IIb, y I) de la cadena pesada de miosina (MHC) para determinar si la inhibición del sistema de calpaínas podría provocar algún cambio en el patrón de expresión característico de cada músculo. Como se observa en la **figura I.B.5**, paneles **A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>** la administración de BDA-410 no generó cambio alguno en la distribución de las isoformas de MHC en ratones C57BL/6 gerontes.

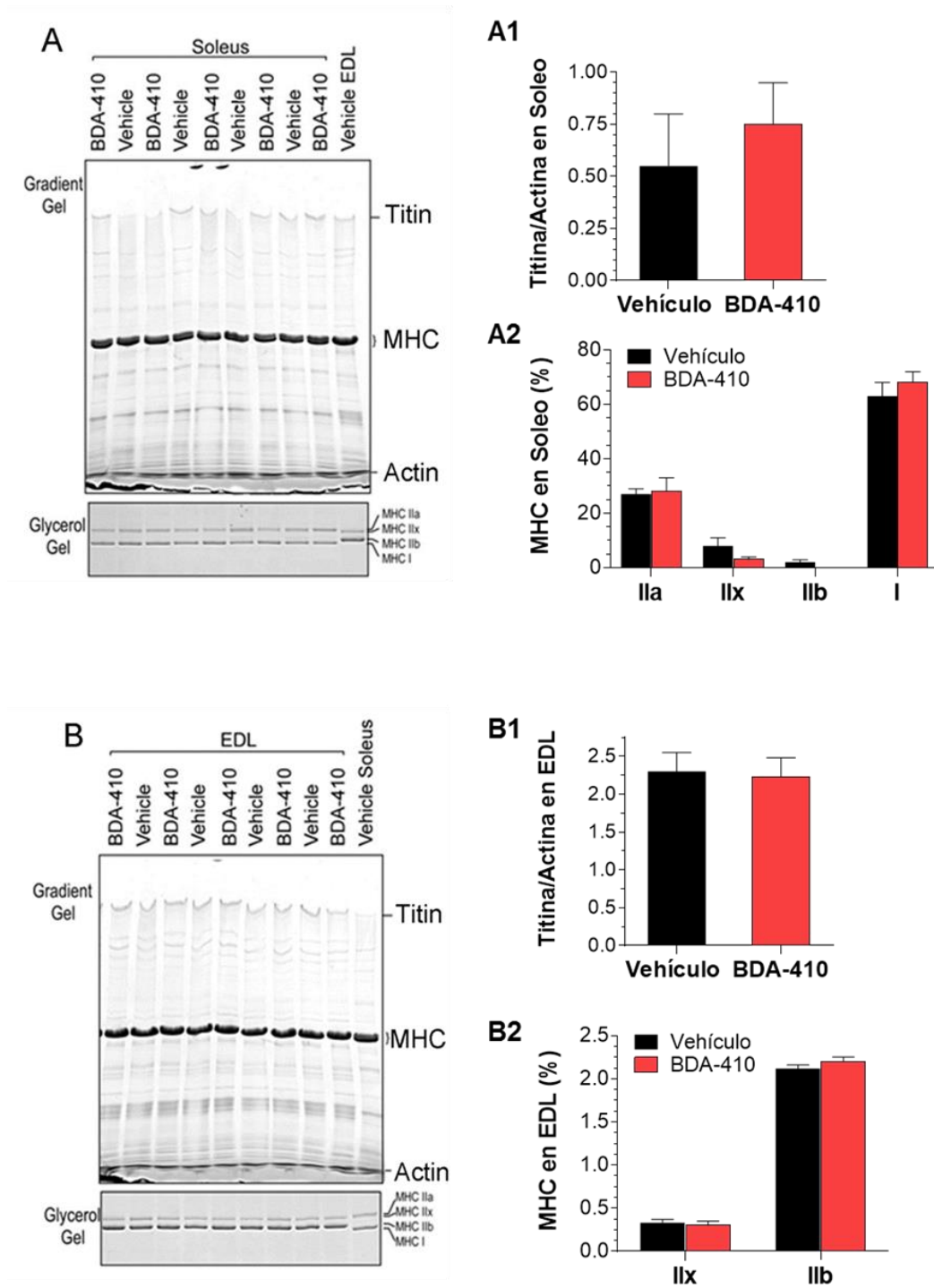
Finalmente, se analizaron los niveles totales de Troponina T y Troponina I variantes lenta y rápida no observándose tampoco diferencias significativas entre ambos grupos experimentales luego de la intervención (**figura I.B.6**).

Estos resultados en conjunto, indican que el aumento en la fuerza de contracción observado luego de la administración del inhibidor de calpaínas no podría ser atribuido a cambios en los niveles de las principales proteínas motoras o en la composición de miofibras del músculo esquelético.

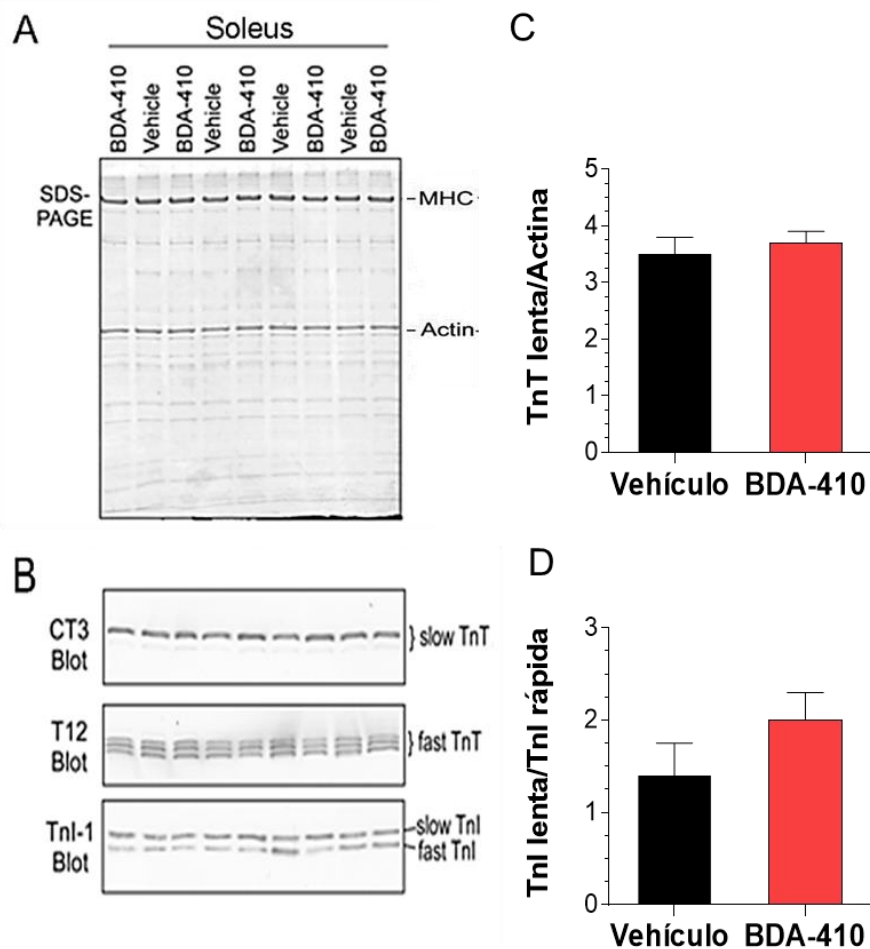




**Figura I.B.4. Efecto de la administración de BDA-410 sobre el contenido total de miosina y actina en músculos Soleo y EDL.** Luego del tratamiento con solución vehículo (n=4) o con BDA-410 (n=5) se identificaron y cuantificaron los niveles de miosina total, actina y se calculó la relación entre ambas para los músculos Soleo (A y A1) y EDL (B y B1). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.



**Figura I.B.5. Efecto de la administración de BDA-410 sobre los niveles de titina y la composición fibrilar en los músculos Soleo y EDL.** Se identificaron y cuantificaron los niveles de titina y las distintas isoformas de la cadena pesada de miosina (MHC tipo IIa, IIx, IIb y I) en los músculos Soleo (**A, A1 y A2**) y EDL (**B, B1 y B2**) aislados de individuos tratados con vehículo (n=4) y BDA-410 (n=5). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.



**Figura I.B.6. Efecto de la administración de BDA-410 sobre los niveles de Troponina T y Troponina I en el músculo Soleo.** Luego de completar la administración de solución vehículo (n=4) o BDA-410 (n=5) por 3 semanas se midieron los niveles de Troponina T (TnT) y Troponina I (Tnl) variantes rápida y lenta y de Actina en el músculo Soleo (A y B) y se calculó la relación entre las mismas (C y D). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

***I.B.5. La inhibición de calpaínas modifica el perfil de fragmentación de TnT3 en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes.***

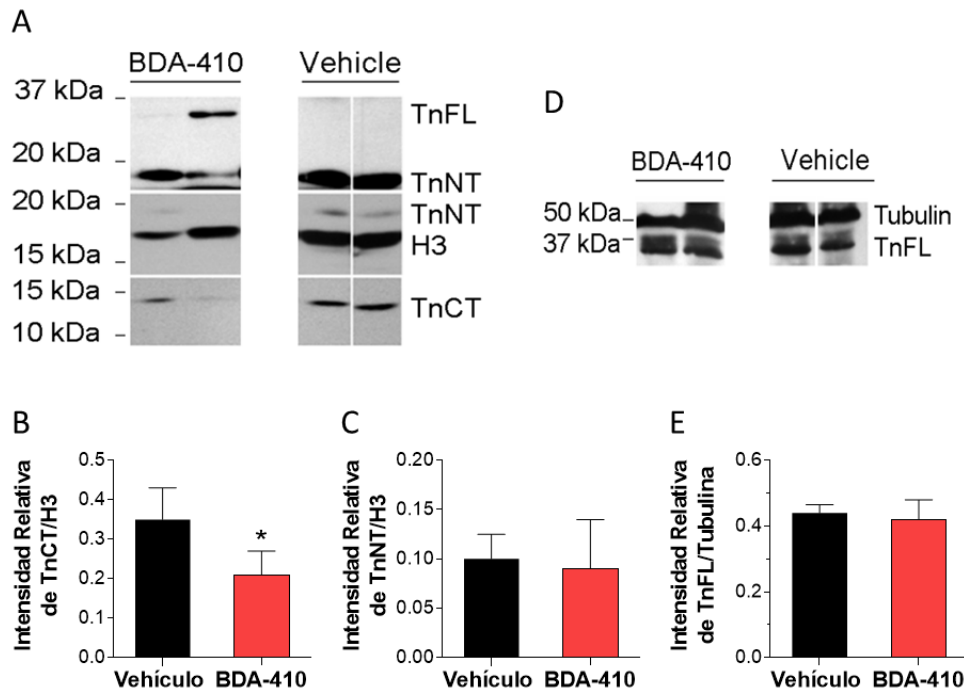
Como se describiera en la Introducción del presente capítulo, el grupo del Dr. Delbono ha reportado que durante el envejecimiento del músculo esquelético se incrementa la proteólisis regulada de la Troponina T, isoforma rápida (TnT3) que genera un fragmento carboxilo terminal (TnT-CT) con efectos deletéreos sobre los mionúcleos.

Dado que el sitio de clivado que separa el fragmento CT del resto de la proteína posee una estructura primaria y secundaria compatibles con aquellas reconocidas por las calpaínas nos preguntamos si la administración de BDA-410 podría prevenir la fragmentación de

TnT3. A continuación se describen los resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Tan Zhang (Laboratorio del Dr. Delbono, WFUSM, USA).

La **figura I.B.7** muestra que luego de la inhibición del sistema de calpaínas en el músculo esquelético de los ratones gerontes se produjo una reducción significativa del fragmento CT encontrado en la fracción proteica nuclear (**panel B**) mientras que el fragmento amino terminal (NT) se mantuvo invariable (**panel C**).

También evaluamos el nivel citosólico de TnT de longitud completa o full length (TnFL). Sorpresivamente, el nivel de TnT de longitud completa o full length (TnFL) no experimentó cambios luego de la administración de BDA-410 (**figura I.B.7E**). Esto puede ser explicado por la abundancia de TnFL asociada a los miofilamentos que torna dificultosa la detección de cambios sutiles pero significativos.



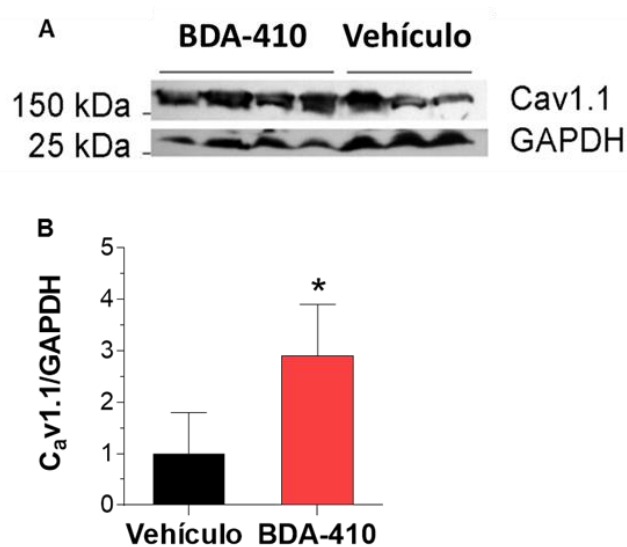
**Figura I.B.7. La administración de BDA-410 estabiliza la fracción de TnT3 nuclear en el músculo esquelético de ratones C57BL/6 gerontes.**

(A) y (D) Western Blots de la fracción proteica nuclear extraída del músculo esquelético de ratones gerontes luego de la administración de solución vehículo (n=3) o BDA-410 (n=3). Se identificaron los fragmentos C- (TnCT) y N-terminal (TnNT) de la TnT3, la proteína full length (TnFL), la Histona 3 (H3) y la Tubulina. (B), (C) y (E) muestran la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a dichas proteínas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. \*p < 0.05.

### ***I.B.6. La inhibición de calpaínas restaura los niveles de Cav1.1 en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes.***

Es bien sabido que uno de los rasgos principales de la sarcopenia es la pérdida de fuerza muscular debido a alteraciones en el proceso de acoplamiento excito-contráctil. Como se mencionara previamente, nuestro grupo de trabajo ha reportado que, durante el envejecimiento, los niveles de la subunidad alfa 1s del canal de calcio del sarcolema Cav1.1 disminuyen significativamente (Taylor et al., 2009) y que TnT-CT parece regular negativamente a nivel transcripcional la expresión de la misma (Zhang T, Pereyra AS, et al., bajo revisión en *Aging Cell*). En función de estos resultados previos, nos propusimos evaluar el efecto de la inhibición de calpaínas y consiguiente reducción de la fragmentación de TnT3 sobre los niveles de expresión de Cav1.1. A continuación se describen los resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Tan Zhang (Laboratorio del Dr. Delbono, WFUSM, USA).

La **figura I.B.8** muestra un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los niveles de expresión de Cav1.1 normalizados por GAPDH en los animales que recibieron BDA-410 en comparación con el grupo control. Tal como se discutirá posteriormente, estos resultados sugieren que la inhibición del sistema proteolítico de calpaínas reduce los niveles del fragmento C-terminal de TnT3 liberando así la regulación negativa sobre la transcripción de *Cacnals* y restaurando los niveles de Cav1.1 en el músculo esquelético de los ratones gerontes.



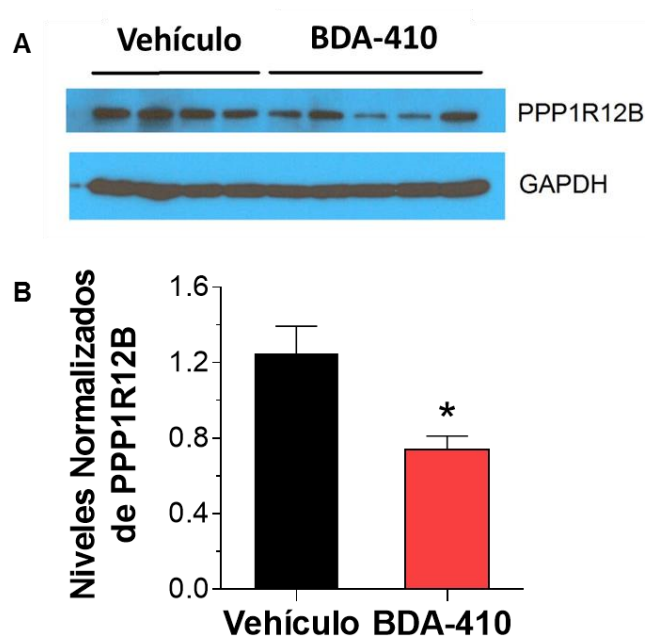
**Figura I.B.8. Efecto de la administración de BDA-410 sobre los niveles de Cav1.1 a nivel proteico.** (A) Inmunoblot de músculos agrupados del miembro trasero de ratones C57BL/6 tratados con vehículo (n=3) o BDA-410 (n=4) para Cav1.1 y GAPDH. (B) cuantificación de los niveles de Cav1.1 expresada como la relación entre esta proteína y el nivel de GAPDH presente en la misma muestra. \* $p < 0.05$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

***I.B.7. La administración de BDA-410 disminuye los niveles de PPP1R12B, la subunidad reguladora de una fosfatasa de miosina, en el músculo esquelético de ratones gerontes.***

Como se señalara previamente, la administración de BDA-410 a ratones C57BL/6 gerontes no modificó los niveles totales de proteínas sarcoméricas como actina, miosina, troponina T (full length), troponina I y titina (**figuras I.B.4, I.B.5 y I.B.6**).

Sin embargo, decidimos analizar más en detalle el perfil proteico del músculo esquelético luego de la intervención terapéutica. Así, al finalizar la administración de BDA-410 o de solución vehículo, se procedió a la identificación y cuantificación comparativa entre ambos grupos de las distintas proteínas celulares. Para ello se realizó una cromatografía líquida a nano-escala acoplada a espectrometría de masas y cuantificación libre de marcado (ver apartado D del presente capítulo). El análisis especializado de los datos crudos indicó niveles significativamente disminuidos de la subunidad reguladora de la fosfatasa de miosina denominada PPP1R12B (Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 12B) en el músculo esquelético de los animales tratados con BDA-410 respecto del grupo control. Esto fue posteriormente confirmado mediante detección por Western Blot en homogenato de tejido (**figura I.B.7**).

Tal como se discutirá luego, esta proteína posee un importante rol en la regulación de la contracción muscular al modular la sensibilidad al calcio del aparato contráctil.



**Figura I.B.7. Efecto de la administración de BDA-410 sobre los niveles de fosfatasa PPP1R12B en músculo esquelético.** (A) Inmunoblot representativo de los niveles de PPP1R12B en lisado de músculo esquelético para ambos grupos, control (n=4) y tratado con BDA-410 (n=5). Los niveles de GAPDH se utilizaron como control de siembra y como valor de referencia para la normalización de los datos luego de su cuantificación (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.  $p=0.012$ .

## I.C DISCUSIÓN

Como se describiera en la Introducción del presente capítulo, ha sido demostrado tanto mediante estudios epidemiológicos en poblaciones humanas como intervenciones experimentales en modelos animales, que la pérdida de fuerza muscular asociada a la edad es más rápida y pronunciada que la pérdida de masa muscular y que por ende deben existir otros factores locales y/o sistémicos con un rol activo en el desarrollo de la sarcopenia.

Previamente, nuestro grupo de trabajo describió como el envejecimiento afecta el acoplamiento excito-contráctil a nivel molecular, reduciendo principalmente los niveles de Cav1.1 en el sarcolema y modificando la estructura y localización celular de proteínas reguladoras de la contracción como la Troponina T.

La Troponina T con su sitio de anclaje para la Tropomiosina (Tm) y en asociación con la Troponina C (TnC) sensible a los niveles  $Ca^{+2}$  citosólico y con la subunidad inhibitoria Troponina I (TnI) forma un complejo acoplado mecánicamente al filamento de actina y regula la contracción muscular (**Gordon, Homsher, & Regnier, 2000**). Adicionalmente a esta localización y función clásicas, demostramos recientemente como la fragmentación controlada de la isoforma rápida (TnT3) en el músculo esquelético postnatal produce un segmento carboxilo terminal (TnT-CT) que se trasloca a los núcleos de la miofibra gracias a la presencia de señales de localización nuclear (NLS) y nucleolar (NoLS). Otros roles no convencionales han sido descritos también para TnI, TnT, Tm, encontrándose la fracción nuclear de varios tipos celulares significativamente enriquecida con estas proteínas (**Asumda & Chase, 2012; Sahota, Grau, Mansilla, & Ferrus, 2009**).

Datos recientes obtenidos por el Dr. Tan Zhang en el laboratorio del Dr. Delbono (WFUSM) señalan que el sitio endógeno de clivado de la TnT3 en el músculo esquelético *in vivo* es compatible con la actividad del sistema proteolítico de calpaínas, similar a como fuera reportado en la literatura para la isoforma cardíaca de TnT (**Streng, de Boer, van der Velden, van Dieijen-Visser, & Wodzig, 2013**) y que existe además una correlación positiva entre la edad del individuo y los niveles nucleares del fragmento TnT-CT, sugiriendo una participación potencialmente activa en la sarcopenia (**T. Zhang, Birbrair, Wang, et al., 2013**). Por otra parte, durante el envejecimiento, la susceptibilidad del músculo esquelético a las injurias aumenta y la homeostasis del calcio intracelular se altera, factores ambos que

pueden contribuir a la activación patológica de las calpaínas (**Faulkner et al., 1993; Salazar et al., 2010**).

Así, nos propusimos evaluar el efecto de la inhibición del sistema proteolítico de calpaínas sobre los fenómenos anteriormente descritos en el músculo esquelético de ratones gerontes sedentarios. Comenzamos por determinar el grado de inhibición de la actividad de dichas enzimas en el músculo de ratones tratados diariamente durante 3 semanas con el inhibidor BDA-410. La misma resultó significativamente disminuida, siendo de solo el 47% respecto del grupo control tratado con solución vehículo. Estos resultados validan nuestro modelo de inhibición *in vivo* del sistema proteolítico mediado por calpaínas. El hecho que la actividad enzimática no se vea completamente abolida puede explicarse por la relativa selectividad de BDA-410 por la isoforma 1 o  $\mu$ -calpaína frente a las Calpaínas tipo 2 (o m-) y tipo 3.

BDA-410 es un péptido-mimético sintético que inhibe de manera selectiva pero reversible a las cisteín-proteasas como las calpaínas. Su grupo ciclopropenona atrae el hidrógeno de los grupos sulfhidrilo ( $-SH$ ) de los residuos de cisteínas presentes en el sitio activo de dichas enzimas (**Carragher, 2006**). Cuando ensayado *in vivo*, en modelos animales, BDA-410 parece atenuar el fenotipo de numerosas patologías como Alzheimer, aneurisma de aorta abdominal, anemia falciforme, malaria, ataxia espinocerebelosa tipo 3 y envejecimiento prematuro (**De Franceschi et al., 2013; X. Li, Chen, Jeong, & Chishti, 2007; Yoko Nabeshima et al., 2014; Simoes, Goncalves, Nobre, Duarte, & Pereira de Almeida, 2014; Subramanian et al., 2012; Trinchese et al., 2008**). En el caso del ratón deficiente en la proteína  $\alpha$ -klotho, un modelo de envejecimiento prematuro y acelerado, la administración diaria de BDA-410 entre la semana 2 y la semana 4 postnatal logró atenuar múltiples variables clásicamente asociadas con la edad avanzada. Así, estos animales mostraron recuperación de la capacidad reproductiva, aumento de tamaño y peso corporal, reducción de la atrofia visceral, supresión de calcificaciones ectópicas, aumento de la densidad mineral ósea y mejora de la arquitectura pulmonar con reducción del patrón enfisematoso. Sin embargo, a pesar que la sarcopenia es un rasgo distintivo del envejecimiento, las características histológicas y/o funcionales del músculo esquelético no fueron evaluadas en este estudio (**Y. Nabeshima et al., 2014**).

Nuestros resultados indican que la administración de BDA-410 a ratones C57BL/6 de 23 meses de edad se asocia con cambios en el patrón de fragmentación de TnT3, aumento



de los niveles de Cav1.1 e incremento de la fuerza específica de contracción sin modificaciones en la resistencia a la fatiga, en el contenido total de las principales proteínas motoras y en la composición de miofibras.

Tal como se mencionara previamente la debilidad muscular que se presenta con la edad avanzada es el resultado de la disminución en masa muscular y en fuerza específica desarrollada por ese tejido. En nuestro modelo, la inhibición de calpaínas mediada por BDA-410 aumentó significativamente la fuerza específica desarrollada por el músculo Soleo (tensión/unidad de área) sin modificar la sección transversa ni la composición porcentual de los distintos tipos de miofibras que componen este músculo mixto (~50/50 de fibras rápidas/fibras lentas). Tampoco se vieron modificados los niveles totales de Actina, Miosina, Titina y Troponina I en los animales que recibieron BDA-410 comparados con el grupo control. Estos resultados señalan entonces un aumento de la eficiencia de contracción que no responde al agregado de nuevas miofibras, ni de nuevos sarcómeros ni a un viraje hacia un predominio de fibras rápidas. Es razonable suponer entonces que el mecanismo responsable del efecto beneficioso de BDA-410 sobre el músculo esquelético sarcopénico podría residir a nivel del acoplamiento excito-contráctil y sus determinantes moleculares.

Demostramos así en la presente tesis, que la inhibición de las calpaínas generó una significativa reducción del fragmento carboxilo-terminal de la Troponina T3 (TnT-CT) en la fracción nuclear de las miofibras. Esto se encuentra en concordancia con los recientes resultados obtenidos por nuestro grupo que predicen una proteólisis dependiente de calpaínas de la TnT3 en función de la secuencia de aminoácidos y estructura secundaria del sitio de clivado. De manera similar, ha sido reportado que la isoforma cardíaca cTnT es blanco de la fragmentación mediada principalmente por  $\mu$ -calpaína y caspasas durante el inicio del proceso apoptótico en los cardiomiocitos (**Streng et al., 2013**). Sorpresivamente, el nivel de TnT de longitud completa o *full length* (TnFL) no experimentó cambios luego de la administración de BDA-410. Esto puede ser explicado por la abundancia de TnFL asociada a los miofilamentos que hace dificultosa la detección de cambios sutiles desde un punto de vista cuantitativo aunque significativos desde uno cualitativo.

Como fuera descripto previamente, nuestro grupo describió que el fragmento TnT-CT se trasloca a los mionúcleos y reprime la transcripción del gen que codifica para la subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio voltaje-dependiente Cav1.1 (*Cacna1s*) mediante interacción directa con la región P5a de su promotor, fenómeno que se incrementa durante el

envejecimiento (**T. Zhang, Birbrair, Wang, et al., 2013**) (*Zhang T, Pereyra AS, et al., bajo revisión en Aging Cell*). Quisimos determinar entonces si la disminución observada en la fragmentación de TnT3 tenía efecto alguno sobre la expresión de  $Ca_v\alpha_1$ . Como se muestra en el presente capítulo, los niveles relativos de  $Ca_v\alpha_1$  medidos en homogenatos de músculo esquelético aumentaron luego del tratamiento con BDA-410. Esto podría representar una “liberación” de la represión ejercida sobre el promotor de  $Ca_v\alpha_1$  por niveles normalmente elevados de TnT-CT y una consiguiente restitución de la expresión de  $Ca_v1.1$  pre-sarcopenia.

Dado que la regulación de la expresión de  $Ca_v\alpha_1$  parece ser multifactorial, no podemos descartar la participación de otros mecanismos en los resultados aquí obtenidos. Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que los niveles celulares de la subunidad accesoria del canal de calcio,  $\beta_{1a}$  ( $Ca_v\beta_{1a}$ ) se correlacionan negativamente con la expresión de  $Ca_v\alpha_1$  en el sarcolema por un mecanismo no relacionado a la transcripción génica (**Taylor et al., 2009**).  $Ca_v\beta$  es la subunidad auxiliar más importante de  $Ca_v1.1$  siendo la isoforma  $\beta_{1a}$  la predominante en el músculo esquelético. La misma se asocia físicamente a un dominio citoplasmático de la subunidad  $\alpha_1$  denominado AID (alpha interaction domain) y resulta indispensable para la correcta inserción de la subunidad  $\alpha_1$  en los túbulos T del sarcolema y la organización en las denominadas “tétradas” donde 4 copias del canal  $Ca_v1.1$  se asocian a una molécula del receptor de rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico.  $Ca_v\beta_{1a}$  facilita también la interacción mecánica entre  $Ca_v1.1$  y RyR que sigue a la despolarización de la membrana, modulando positivamente el acoplamiento excito-contráctil (**Buraei & Yang, 2013**). En 2007 se describió para la isoforma cardíaca  $\beta_{2a}$  una nueva función, encontrándose que regula el recambio del canal de calcio y otras proteínas de la membrana celular mediante un mecanismo endocítico dependiente de dinamina. Así, la sobreexpresión de dicha subunidad  $\beta_{2a}$  provoca un aumento de la internalización del canal de calcio  $Ca_v1.2$  localizado en la membrana plasmática (**Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte, Neely, & Hidalgo, 2007**).

Otros factores que modulan los niveles de  $Ca_v1.1$  son los niveles tisulares de IGF-1 (**Renganathan, Messi, Schwartz, & Delbono, 1997; Z. M. Wang, Messi, Renganathan, & Delbono, 1999**) y las modificaciones post-traduccionales que experimenta el propio  $Ca_v1.1$ . En el músculo esquelético y cardíaco ha sido ampliamente descripta la proteólisis del extremo carboxilo-terminal de  $Ca_v\alpha_1$  aún luego de su inserción en el sarcolema (**Abele & Yang, 2012; Hulme et al., 2005**). La misma parece estar mediada por el sistema

proteolítico de calpaínas o enzimas relacionadas (**Hulme et al., 2005**). Un mecanismo similar ha sido reportado en el cerebro, donde la isoforma correspondiente de  $Cav\alpha_1$  parece ser clivada en su extremo CT, generando un fragmento que luego se trasloca a el núcleo de las células del SNC cumpliendo funciones como factor de transcripción. Por otra parte, su generación se ve notablemente reducida luego de la administración de inhibidores de calpaínas (**Hell et al., 1996**). Así, coexisten en situaciones fisiológicas dos formas de dicha subunidad, una de longitud completa o full length y una truncada. En el corazón, por ejemplo, aproximadamente el 80% de los canales  $Cav1.2$  se encuentran como forma truncada por lo que la misma parece retener importantes funciones biológicas (**De Jongh, Warner, Colvin, & Catterall, 1991**).

En el músculo esquelético el fragmento  $Cav\alpha$ -CT de 45 kDa parece ser un elemento importante para el funcionamiento general del canal, afectando sus propiedades mediante interacciones con calmodulina, con la subunidad  $\beta_{1a}$ , con PKA (proteín-quinasa dependiente de cAMP) y CaMKII (quinasa dependiente de calcio-calmodulina) y también al estar involucrado en el direccionamiento de la propia  $Cav\alpha_{1s}$  hacia el sarcolema (**T. Gao, Bunemann, Gerhardstein, Ma, & Hosey, 2000; Sculptoreanu, Scheuer, & Catterall, 1993; Zuhlke & Reuter, 1998**). La revisión de la literatura disponible revela que los niveles del fragmento  $Cav\alpha$ -CT se correlacionan negativamente con la actividad de  $Cav1.1$  y  $Cav1.2$ . El clivaje parece tener entonces efectos deletéreos mediante tres mecanismos: (1) pérdida del sitio de interacción con AKAP-15, una proteína del sarcolema que sirve como anclaje para la PKA durante su actividad quinasa sobre  $Cav\alpha_{1s}$  (**Gray, Tibbs, Catterall, & Murphy, 1997; Hulme, Ahn, Hauschka, Scheuer, & Catterall, 2002**); (2) elevación del umbral de voltaje necesario para la apertura del poro, fenómeno este mediado por la re-asociación del fragmento libre CT que actúa de manera auto-inhibitoria (**Hulme, Yarov-Yarovoy, Lin, Scheuer, & Catterall, 2006**) y (3) translocación del fragmento CT al núcleo y represión del promotor de  $Cav\alpha$  (**Schroder, Byse, & Satin, 2009**). En resumen, al perderse el fragmento CT se reduce sustancialmente la capacidad de potenciación (aumento de la corriente de calcio hacia el citosol) que ejercen PKA y CaMKII mediante las fosforilaciones y se requiere un estímulo voltaico mayor para la activación del canal, lo que se traduce en una menor eficiencia del proceso global de contracción con disminución de la fuerza generada por el músculo.

Debemos considerar entonces que, además de la demostrada regulación ejercida por TnT3, mecanismos similares a los aquí descritos podrían estar contribuyendo al aumento

en los niveles de Cav1.1 y en la fuerza de contracción observados en el músculo esquelético de ratones gerontes luego de la administración de BDA-410. Será importante determinar en un futuro si Cav $\alpha_{1s}$  es sustrato de las calpaínas y cuál es su rol, si alguno, en el desarrollo de la sarcopenia.

Por último, demostramos también que, la inhibición del sistema de calpaínas en nuestro modelo murino se asoció a una disminución de la subunidad regulatoria de la fosfatasa de miosina denominada PPP1R12B (Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 12B). La fosfatasa de miosina es un complejo proteico formado por tres subunidades: (1) una subunidad catalítica denominada protein-fosfatasa 1 delta o PP1c- $\delta$ ; (2) una subunidad regulatoria mayor o MYPT y (3) una subunidad regulatoria menor denominada sm-20. Su presencia en la célula es abundante y está involucrada en numerosos procesos biológicos mediante la desfosforilación de miosina. Para la subunidad regulatoria mayor se han descrito tres variantes: Mypt1, Mypt2 o PPP1R12B y MBS85 (**Dippold & Fisher, 2014**). PPP1R12B se expresa predominantemente en el músculo estriado y en el cerebro y, desde el punto de vista funcional, se considera que modula positivamente la actividad fosfatasa que la subunidad catalítica ejerce sobre las moléculas de miosina (**Grassie, Moffat, Walsh, & MacDonald, 2011**). Nuestros resultados sugieren que la reducción de los niveles de PPP1R12B regularía negativamente la actividad fosfatasa de PP1c- $\delta$ , incrementando de manera indirecta los niveles de miosina fosforilada lo que a su vez aumentaría la sensibilidad de los miofilamentos al calcio y con ello la fuerza de contracción.

Podemos concluir entonces que los resultados que se exponen en el presente capítulo demuestran que (1) la inhibición del sistema proteolítico de calpaínas en el músculo esquelético de ratones C56BL/6 gerontes se asocia a un aumento en la fuerza de contracción sin modificación alguna de la masa muscular ni de la composición de miofibras; (2) que dicho incremento en la eficiencia contráctil se asocia con una disminución en la fragmentación de TnT3, con consiguiente reducción de la presencia del fragmento deletéreo C-terminal y con aumento de la expresión del canal de calcio del sarcolema, Cav1.1 y (3) la reducción en los niveles de PPP1R12B observados luego de la administración de BDA-410 podría constituirse como un factor co-adyuvante en la mejora de la fuerza de contracción al aumentar la sensibilidad del aparato contráctil al Ca<sup>+2</sup> citosólico.

## I.D MATERIALES Y METODOS

### 1) **Ámbito del estudio.**

La serie de experimentos que componen el presente capítulo fue realizada por la tesista en el laboratorio del Dr. Osvaldo Delbono (Co-director de Tesis y Beca Doctoral), Departamento de Medicina Interna y Gerontología, Wake Forest University School of Medicine – Baptist Medical Center, Winston Salem, Carolina del Norte, EEUU. Las colaboraciones realizadas por otros investigadores/centros se señalan oportunamente.

### 2) **Diseño metodológico.**

El plan metodológico propuesto para responder a los interrogantes científicos planteados en el presente proyecto de investigación constituye un diseño de tipo experimental, prospectivo y longitudinal. Para el mismo se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 salvaje, de 23 meses de edad, los cuales fueron agrupados de manera aleatoria en dos cohortes, una de sujetos control y otra de sujetos experimentales. Ambas fueron evaluadas antes y después de la administración diaria y por 3 semanas de BDA-410, un inhibidor del sistema proteolítico mediado por calpaínas. Para ambos grupos se registraron variables relacionadas con la fuerza muscular y el metabolismo energético del músculo esquelético (**figura I.D.1**).



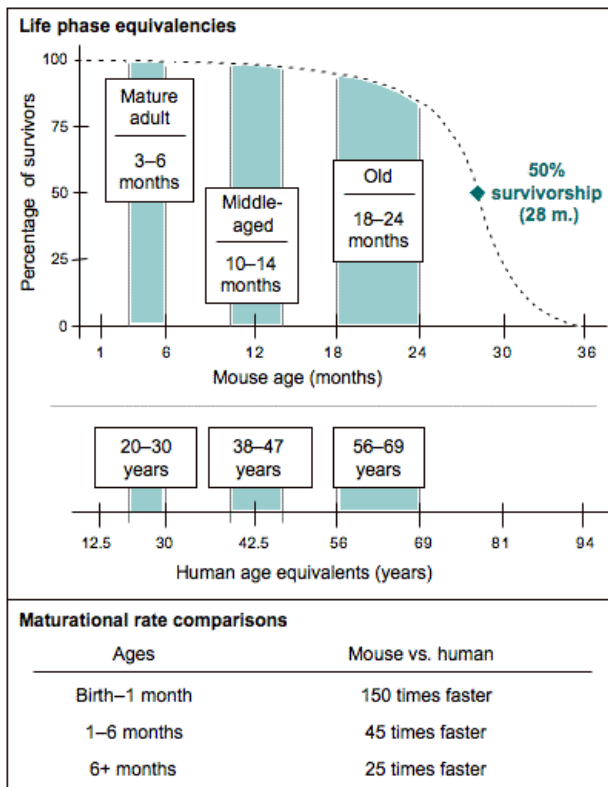
**Figura I.D.1. Diseño experimental.** Representación gráfica del procedimiento global llevado a cabo para analizar el efecto de la inhibición del sistema de calpaínas sobre la sarcopenia. Así, dos grupos de ratones C57BL/6 hembra de 23 meses de edad fueron tratados diariamente y por un periodo de 3 semanas, con una solución vehículo (Tween 80® al 1% en NaCl 0.09%) para el grupo control y una suspensión del inhibidor de calpaínas BDA-410 (disuelto en vehículo) para el grupo experimental.

La administración se realizó por vía oral a una dosis de 30 mg/kg/día en un volumen equivalente a 10 ml/kg. En ambos grupo se evaluaron, antes y después de la administración de Vehículo o BDA-410, parámetros como peso corporal, composición corporal, ingesta calórica diaria y actividad locomotriz. Luego de finalizado el periodo experimental los animales fueron eutanasiados y se procedió a la obtención de muestras para determinar la fuerza muscular y sus determinantes moleculares, el perfil de expresión génica y el perfil proteico general.

### **3) Características de los animales de experimentación. Criterios de selección.**

Para los experimentos del presente capítulo se utilizaron ratones hembra salvajes o wild type de la cepa C57BL/6 de 23 meses de edad obtenidos del National Institute on Aging (NIA, Bethesda, MD, USA). A esta edad los ratones de esta cepa se consideran gerontes, reflejan cambios senescentes en casi todos los biomarcadores utilizados para su caracterización y pueden compararse a un ser humano de 70 años de edad (**figura I.D.2**) (**Flurkey, 2007**). A los 28 meses de vida solo el 50% de los individuos sobrevive por lo que la utilización de edades más avanzadas como modelo de envejecimiento resulta dificultoso. El límite superior recomendado para la experimentación con esta cepa suele ser 24 meses de edad.

Los ratones fueron alojados en el área de bioterio libre de patógenos de Wake Forest University School of Medicine (WFUSM), en racks ventilados a razón de cuatro individuos por caja, con un ambiente acondicionado a 20-23 °C y con un fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12 horas. Los ratones se alimentaron ad-libitum y tuvieron acceso permanente al agua de bebida. La manipulación y experimentación realizada sobre estos animales fue previamente aprobada por el comité local para el Cuidado y Uso de Animales de laboratorio de WFUSM. El número total de ratones utilizados se detalla en cada apartado experimental y a continuación se presentan los criterios de inclusión, exclusión y eliminación utilizados para determinar la selección final de los individuos (**tabla I.D.1**).



**Figura I.D.2. Estadios de vida de los ratones C57BL/6J y su equivalencia con los seres humanos.** Adaptado de: *Life span as a biomarker. The Jackson Laboratory.*

Crterios De Inclusion	Crterios De Exclusion	Crterios De Eliminaci3n
Ratones de la cepa C57BL/6 Wild Type (WT)	Malformaciones visibles en los miembros delanteros y/o traseros	Presencia de alteraciones ffsicas no relacionadas a la intervenci3n
Hembras	Dificultades motrices de cualquier tipo	Muerte espontnea con o sin causa aparente.
23 meses de edad	Sospecha y/o evidencia de patologfas que pudieran comprometer el estado general de salud del animal.	
	Animales bajo tratamiento mdico-veterinario.	

**Tabla I.D.1. Selecci3n de los individuos: criterios de inclusi3n, exclusi3n y eliminaci3n.** La presente tabla muestra los criterios utilizados para la selecci3n de los animales que fueron incorporados a los grupos experimentales y mantenidos en ellos durante toda la duraci3n del proceso experimental.

#### 4) Inhibidor de Calpaínas BDA-410.

BDA-410, (2S)-N-(1S)-1-[(S)-Hidroxi(3-oxo-2-fenil-1-ciclopropen-1-yl)metil]-2-metilpropil-2-benzenosulfonilamino-4-metilpentanamida, es un derivado de la ciclopropenona sintetizado por la compañía Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation (Yokohama, Japón). Este grupo de compuestos muestra de manera genérica, una fuerte actividad inhibitoria contra las proteasas de cisteína (Ando et al., 1999). BDA-410 es un inhibidor potente y selectivo de la actividad proteasa de las calpaínas mostrando una cinética de carácter competitivo y reversible. Dentro de su estructura molecular, el grupo ciclopropenona atrae hacia sí mismo el átomo de hidrogeno de los residuos -SH de los aminoácidos cisteína que forman parte de la molécula de calpaína (figura I.D.3). Puede ser administrado por vía oral. Sus principales propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas se muestran en la Tabla I.D.2 (X. Li et al., 2007).

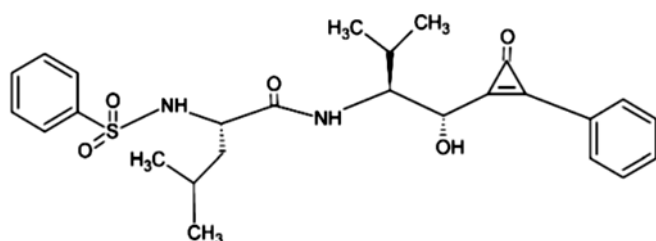


Figura I.D.3. Estructura molecular del inhibidor de calpaínas BDA-410

Propiedad	BDA-410
Formula Molecular	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S
Peso Molecular	484.61
Vida Media	~400 minutos
Calpaína 1-Calpaína2 IC <sub>50</sub>	21.4 nM
Calpaína 1 K <sub>i</sub>	130 nM
Calpaína 2 K <sub>i</sub>	630 nM
Principal sitio de absorción	tracto intestinal

Tabla I.D.2. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de BDA-410.



### **5) Administración de BDA-410 in vivo. Protocolo de tratamiento.**

Los ratones C57BL/6 de 23 meses de edad utilizados en esta serie de experimentos fueron separados de manera aleatoria en dos grupos asegurando la homogeneidad de los mismos en cuanto al peso corporal inicial de los individuos. El grupo control, referido también como grupo vehículo, fue tratado durante 21 días consecutivos con Tween 80 al 1% disuelto en solución salina normal mientras que el grupo experimental o grupo BDA-410 (BDA-410) recibió 30 mg/kg/día del inhibidor de calpaína BDA-410 disuelto en el vehículo mencionado previamente. En ambos casos la vía de administración fue oro-esofágica directa (gavage) utilizando una sonda rígida de alimentación (20G, 30 mm longitud, Núm. Cat. 18060-20, F.S.T<sup>®</sup>) y cada individuo recibió el equivalente a 10 mL/kg de peso de la sustancia correspondiente. Ha sido reportado en la literatura que en ratones, esta dosis y vía de administración genera una concentración plasmática media de aproximadamente 24 nM y un pico de 11.87 ng/mL post administración oral en bolo suficiente para penetrar en los tejidos y ejercer su efecto inhibitorio (**Trinchese et al., 2008**).

### **6) Ensayo in vitro de inhibición de calpaínas.**

Para determinar la actividad de calpaína en tejidos biológicos post-mortem se utilizó el método descrito por Supinski y colaboradores (**Supinski, Wang, & Callahan, 2009**). Brevemente, se agregaron 100 µg de proteína total (extraída de homogenatos de los músculos Isquiotibiales de las extremidades traseras -Bíceps Femoris, Semitendinoso y Semimembranoso- post tratamiento/intervención) a un buffer de 50mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol, pH: 7.4, un sustrato fluorogénico que es naturalmente reconocido y clivado por calpaínas [succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metil-cumarina (Suc-LLVY-AMC)] y un inhibidor de calpaína altamente específico (0.1 mg/ml del inhibidor III de calpaína o carbobenzoxi-valinil-fenilalanina). Inmediatamente después de la adición del sustrato fluorogénico se realizó una medida de la fluorescencia de base emitida por la 7-amido-4-metilcumarina (AMC) utilizando un espectrofluorómetro a una frecuencia de 360 nm de excitación y 460 nm de emisión (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se utilizaron estándares de AMC para la curva de calibración y la actividad de las proteasas calpaínas se expresó en nanomoles de AMC generados por minuto y por miligramo de proteína derivada del homogenato de tejido. La diferencia en la generación de AMC en presencia y ausencia del inhibidor III de calpaína

se tomó como un indicador de la actividad de calpaína en la muestra. Es importante señalar aquí que dicho inhibidor no bloquea la actividad proteolítica del proteosoma o de otras proteasas. Para cada muestra se realizaron determinaciones por duplicado.

### **7) Obtención y preparación de músculos esqueléticos.**

Los animales fueron eutanasiados luego de completar el tratamiento con la solución Vehículo o con BDA-410 durante 3 semanas. Excepto se indique lo contrario, la disección y obtención de los músculos se realizó de manera rápida y en condiciones libres de enzimas degradativas del ARN (ARNasas). A posteriori se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis. Para la medición *in vitro* de la actividad proteasa de las calpaínas endógenas se utilizaron los músculos Isquiotibiales de las extremidades traseras (Bíceps Femoris, Semitendinoso y Semimembranoso) y para la extracción de ARN para RT-PCR se reservaron los músculos Flexor Digitorum Brevis (FDB). Los músculos Soleo se disecaron y mantuvieron “en fresco” para los registros electrofisiológicos. Los músculos EDL se procesaron para la técnica de Western Blot.

#### **A. Extracción de ARN, transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR).**

La extracción de ARN total desde los músculos Flexor Digitorum Brevis (FDB) de ratones jóvenes y gerontes se realizó con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. El nivel de expresión de genes seleccionados como TnT3 y GAPDH se analizó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa de tipo cuantitativa (qPCR, Mx3000, Stratagene, La Jolla, CA). Se utilizaron 10 ng de ARN total por reacción a los cuales se adiciono qRT-PCR master mix, primers/sondas Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA), retro-transcriptasa reversa superscript III (Invitrogen) y un inhibidor de RNasa (Promega, Fitchburg, WI) hasta un volumen final de reacción de 25 µl. Los parámetros establecidos para la amplificación fueron 48°C, 45 minutos x 1 ciclo; 95°C, 10 minutos x 1 ciclo; 95°C, 15 segundos, x 1 ciclo; y 60°C, 1 minuto, x 40 ciclos.

#### **B. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y western blotting (WB).**

La técnica que aquí se describe fue realizada en colaboración con el Dr. Jian-Ping Jin (Department of Physiology, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA)

y con el Dr. Tan Zhang (Investigador Asistente en el Laboratorio del Dr. Delbono, WFUSM, USA).

#### **a) Troponina T (TnT)**

A fin de aislar Troponina T de longitud total o full length (TnT-FL) y sus fragmentos amino (TnT-NT) y carboxilo terminal (TnT-CT) y Troponina I (TnI) de los distintos compartimientos subcelulares se procedió como se describe en Zhang, T and cols. 2013 (Tan Zhang, Birbrair, Wang, et al., 2013). Los músculos Soleo y EDL congelados inicialmente en nitrógeno líquido se fragmentaron en pequeños trozos y se les agregó buffer de corrida (Laemmli buffer o loading buffer) conteniendo 2% SDS y 3%  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 8.8 en una relación 40:1 respecto del peso del músculo ( $\mu$ l/mg). A continuación se procedió a la disgregación mecánica con homogeneizador eléctrico a alta velocidad. Las muestras fueron luego calentadas a 80°C por 5 min y centrifugadas a 14000 g for 5 minutos a fin de remover los detritos insolubles. El sobrenadante resultante se sembró en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (PA) 14 % (relación acrilamida:bisacrilamida de 180:1 con el agregado de SDS) preparado en buffer Laemmli modificado. Luego de la corrida electroforética las bandas con proteína fueron visualizadas con Coomassie Blue R-250 y la intensidad de las mismas cuantificada mediante ImageJ software (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD). La banda correspondiente a la proteína Actina se utilizó como referencia para normalizar el resto de la muestra.

Por otro lado, un duplicado del mismo gel fue transferido a membrana de nitrocelulosa mediante un sistema semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a corriente constante de 5 mA·cm<sup>-2</sup> por 15 minutos. Las membranas así transferidas se bloquearon durante 15 minutos con 1% BSA (Bovine Serum Albumine) en Tris-buffer (TBS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego, se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-TnI, anti-TnI-1 (**Jin et al., 2001**), anti-TnT variante lenta o anti-TnT variante rápida (**Jin & Chong, 2010**) diluidos en TBS + 0.1 % de BSA. Se lavaron 3 veces durante 7 minutos con TBS + 0.5% Triton X-100 y 0.05% SDS y a continuación se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con IgG marcada con fosfatasa alcalina (cabra anti-ratón, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). A fin de visualizar las bandas de proteínas reconocidas inicialmente por los mAbs, las membranas se lavaron nuevamente y se revelaron con una solución de nitroazul de tetrazolio + 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato, sustrato marcado para la fosfatasa alcalina.

### **b) Cadena Pesada de Miosina (MHC)**

Las isoformas de MHC se evaluaron como fuera descrito previamente por H.Z. Feng y cols. (Feng, Hossain, Huang, & Jin, 2009). Brevemente, 5 µg de proteína total aislada de homogenato de tejido muscular se sembraron en un gel de PA al 8% (relación acrilamida:bisacrilamida de 50:1 con el agregado de SDS y glicerol al 30%). Una vez finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con Coomassie Blue R250 y las cantidades relativas de las distintas isoformas de MHC se cuantificaron mediante densitometría bi-dimensional usando el software ImageJ.

### **c) Cav1.1 y Cavβ1a**

A fin de aislar las fracciones citosólica y de membrana donde estas proteínas residen se procedió como se describe a continuación (Leung, Imagawa, & Campbell, 1987; Taylor et al., 2009).

Para obtener la fracción de membrana que contiene los túbulos T (microsomas) se utilizó un protocolo modificado de (Knudson et al., 1989). Los músculos fueron disecados, pulverizados en nitrógeno líquido y finalmente homogenizados mecánicamente en Buffer A previamente refrigerado (20 mM pirofosfato de sodio, 20 mM fosfato sódico monobásico, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 303 mM sacarosa con inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). El homogenato se centrifugó a 7000 g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugo a 100000 g por 90 minutos a 4°C en una ultracentrífuga con rotor Beckman tipo Ti.70i. A continuación el pellet se lavó con PBS refrigerado, se resuspendió en buffer Digitonina (1% digitonina (w/v), 185 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES pH 7.4 con inhibidor de proteasas) y se mantuvo en hielo durante 1 hora. La concentración de proteínas totales se midió mediante ensayo del ácido bicinoninico (BCA).

Para la detección de la subunidad Cavβ<sub>1a</sub> los microsomas aislados se mezclaron con igual volumen de buffer con β-mercaptoetanol y se llevaron a ebullición por 5 minutos. Para la detección de Cav1.1, la fracción microsomal se mezcló con igual volumen de buffer Urea y se incubo a temperatura ambiente por 30 minutos (Murray & Ohlendieck 1998). En ambos casos, para la electroforesis se utilizó el sistema Mini-Protean (BioRad Laboratories, Hemel-Hempstead, Herts., UK) con geles de 4.5% + 10% (stacking y resolving respectivamente). Luego, los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF (Amersham Health, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) durante al menos 12 horas a 4°C, bloqueados en leche

descremada al 5% con 0.1% de Tween en TBS para Cav $\beta$ <sub>1a</sub> y PBS para el resto de los anticuerpos. La concentración de los anticuerpos primarios fue como se detalla a continuación: 1:1000 (Cav $\beta$ <sub>1a</sub>, monoclonal VD21 Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA), 1:5000 (Cav1.1, monoclonal IIF7, donado generosamente por el Dr. Kevin P. Campbell, University of Iowa) y 1:250,000 para Actina (Chemicon International, Temecula, CA, USA). El anticuerpo secundario (NA931V cabra anti-ratón, Amersham Health, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) se utilizó a una dilución de 1:5000 y su actividad peroxidasa se detectó mediante un kit comercial (Amersham ECL Plus, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Finalmente la intensidad de las bandas se cuantificó usando un sistema de detección de imágenes diseñado para tal fin (Kodak Gel Doc, Carestream Health Inc., Rochester, NY).

### **8) Anticuerpos.**

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta serie de experimentos como así también sus diluciones se detallan a continuación: Anticuerpos primarios, Cav $\beta$ <sub>1a</sub>, 1:1000, monoclonal VD21, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; Cav1.1, 1:5000 monoclonal IIF7, donado generosamente por el Dr. Kevin P. Campbell, University of Iowa; Actina 1:250,000, Chemicon International, Temecula, CA; TnT3, policlonal, Aviva Systems Biology, San Diego, CA; TnT1 CT3, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; MHC MF20, monoclonal, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA

Anticuerpos secundarios: NA931VS oveja anti-ratón, 1:25000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; NA9340V burro anti-conejo, 1:25000, Amersham Health, Little Chalfont, Buckinghamshire.

### **9) Determinación de la fatigabilidad muscular in vivo**

Luego de 3 semanas de tratamiento con Vehículo o BDA-410, se procedió a registrar el perfil de fatiga de los músculos del compartimiento posterior del miembro trasero derecho (Tríceps Surae: Gastrocnemio y Soleo). Se utilizó un transductor de fuerza (Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canadá) que permite registrar la producción de fuerza generada durante la flexión plantar del pie del ratón a raíz de un estímulo eléctrico. Para tal fin, los animales se anestesiaron con una mezcla de O<sub>2</sub> e Isoflurano 2% a un flujo constante de 2 litros/minuto, se removió el pelo que cubre la rodilla derecha y se fijó el pie al transductor del dispositivo

(pedal). A fin de estimular la contracción de los grupos posteriores del miembro trasero se procedió a colocar un electrodo subcutáneo inmediatamente por sobre el nervio peroneo común. Inicialmente se ajustaron la tensión en reposo del grupo muscular y la intensidad de la estimulación eléctrica a fin de obtener la fuerza tetánica máxima. A continuación se ejecutó un protocolo de fatiga muscular estimulando el nervio con pulsos eléctricos de 60 Hz y 250 milisegundos de duración cada 2 segundos por un total de 5 minutos. La flexión plantar resultante fue registrada y analizada mediante el software que acompaña al equipo (615A Dynamic Muscle Control and Analysis Software, Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canadá). El Índice de Fatiga (IF; relación entre la tensión o fuerza desarrollada por el/los músculo/s a cada minuto y la máxima tensión inicial correspondiente al minuto 0) se calculó a partir de los valores de tensión o fuerza alcanzados a 0, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos.

#### **10) Determinación de la fatigabilidad muscular in vivo.**

Se evaluó la fatigabilidad muscular antes y después del tratamiento mediante el siguiente protocolo de actividad forzada en la cinta de correr para roedores (Exer 6 Lane Treadmill, Columbus Instruments, Columbus, OH). Durante la aclimatación se permitió a los ratones correr por 5 minutos a 10 m/min (baja velocidad) en los días 1 y 2, y en el día 3 lo hicieron por 5 min a 10 m/min seguido de incrementos de 2 m/min y dos minutos de duración hasta alcanzar una velocidad de 20 m/min (velocidad media-alta). Finalmente, al cuarto día se registró la performance de los animales de la siguiente manera: la velocidad inicial se determinó a 10 m/min por un periodo de 5 minutos de duración y luego se incrementó 2 m/min cada 2 minutos hasta un máximo de 24 m/min (alta velocidad) o hasta evidenciar signos de fatiga extrema (el individuo permanece  $\geq 10$  segundos en el área donde recibe el estímulo eléctrico aversivo). Para cada individuo se registró la máxima velocidad tolerada. En ningún momento del protocolo se utilizó inclinación.

#### **11) Evaluación de la fuerza de agarre**

La fuerza de agarre de los ratones antes y después de la intervención experimental fue evaluada mediante el test de la pantalla invertida de Kondziela. Este provee una medida general de la fuerza y resistencia muscular del individuo (S. P. Brooks & Dunnett, 2009; Graber, Ferguson-Stegall, Kim, & Thompson, 2013). El dispositivo consiste en 30 cm<sup>2</sup> de una malla metálica (cuadrados de 12 mm) rodeada de un marco de madera de 5 cm. A fin de

evaluar la performance de los ratones, los mismos se colocaron de manera individual en el centro del dispositivo mientras este se mantenía vertical por aproximadamente 2 segundos. A continuación el mismo fue rotado a la posición horizontal de manera tal que el ratón se encontraba en posición invertida, ubicado entre la pantalla y una superficie acolchonada a 40-50 cm por debajo. Para cada individuo se registró el tiempo transcurrido desde que la pantalla alcanza la posición horizontal hasta que el animal se suelta y cae. El valor final individual se obtuvo del promedio entre 3 evaluaciones y se expresó en segundos.

## **12) Determinación de la fuerza muscular ex vivo.**

Al finalizar la intervención experimental, se practicó la eutanasia a los animales y los músculos Soleo de ambas extremidades traseras fueron disecados, colocados en solución de Krebs refrigerada y se procedió a la remoción cuidadosa del tejido conectivo circundante con asistencia de una lupa estereoscópica. Como sistema de anclaje del músculo al transductor de fuerza (407A force transducer, Aurora Scientific; compliance: 0.01 micrones/mN, frecuencia de resonancia: 4.0 kHz) y al controlador de estiramiento/longitud se utilizaron clips de papel aluminio en forma de T donde la porción horizontal envuelve el tendón correspondiente y la porción vertical sirve de conexión o anclaje con las estructuras mencionadas (**Gonzalez, Messi, Zheng, & Delbono, 2003**). Una vez colocado en posición dentro de la cámara de registros el músculo fue continuamente perfundido con una solución de registro (mM: NaCl 121, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 0.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, NaHCO<sub>3</sub> 24.0, glucosa 5.5, clorhidrato de *d*-tubocurarina 0.015) tamponada (pH 7.4), gaseada con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> y a 22°C. Previo a los registros se permitió que se balancee con la solución circundante durante 15 minutos y a continuación se procedió a estimularlo directamente con un pulso eléctrico generado entre dos electrodos paralelos de platino. La longitud del músculo (L<sub>0</sub>) se ajustó hasta que un pulso único (twitch) o un tren de pulsos (tetanus) generara la máxima fuerza de contracción bajo condiciones isométricas. Luego, se permitió la recuperación del músculo por 8 minutos y a continuación se registró la fuerza de contracción utilizando trenes de pulsos de 400 ms de duración a 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 150 Hz. El intervalo sin pulsar entre las distintas frecuencias ensayadas se determinó de acorde a la magnitud del estímulo (entre 0.5 y 8 minutos). La fatigabilidad del músculo Soleo se estudió mediante secuencias de pulsos de la máxima frecuencia que generó la máxima tensión (150Hz). Cada pulso tuvo una duración de 400 ms con 1 ms de intervalo y 5 minutos

continuos de estímulo. El Índice de Fatigabilidad (IF) fue calculado como se describiera previamente. Todos los registros se obtuvieron y analizaron utilizando ASI600A Digital Controller software (Aurora Scientific Inc.).

### **13) Perfil proteico total (Proteómica)**

*La presente metodología se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Cristina Furdui (Department of Molecular Medicine, WFUSM, Winston Salem, NC, USA) bajo la supervisión e invaluable asistencia del Dr. Nelmi Devarie Báez.*

#### **Cromatografía líquida a nano escala acoplada a espectrometría de masas en tándem (nano LC-MS/MS)**

Inicialmente los homogenatos de músculo Soleo (3 replicados/grupo) se evaluaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. A continuación los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue (R-250) a fin de revelar las bandas de los mismos y cada calle fue dividida en 9 fragmentos idénticos los cuales fueron digeridos con tripsina siguiendo el protocolo habitual de digestión en gel (Aitken & Learmonth, 2002).

El análisis de Espectrometría de Masas (EM) se realizó en un espectrómetro de alta resolución (LTQ Orbitrap Velos Pro high-resolution) acoplado a un nano-cromatógrafo líquido multidimensional en modo splitless (Thermo Fisher/Dionex). Los péptidos se separaron en columnas Thermo Scientific Acclaim PepMap RSLC a un flujo de 300 nL/min, utilizando un gradiente de solución A (ácido fórmico 0.1%, acetonitrilo 5% en agua) y B (ácido fórmico 0.1%, acetonitrilo 80% en agua) de 160 minutos. El espectrómetro de masas se operó en un modo datos-dependiente. El primer escaneo se adquirió en el Orbitrap a 60,000 resoluciones (m/z 150–2000). Los escaneos de masa siguientes (EM/EM) fueron colectados en la trampa iónica para los 15 iones más intensos empleando disociación inducida por colisión.

#### **Cuantificación libre de marcado (label-free) utilizando Precursor Intensity in Software Platform.**

Las proteínas se identificaron y cuantificaron (intensidad del péptido precursor) mediante Proteome Discoverer 1.4 (PD, Thermo Scientific). Los archivos derivados de la EM (formato .raw, Thermo Scientific) fueron contrapuestos con la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Los criterios delineados de la búsqueda se detallan a continuación: enzima: tripsina; máximos sitios de clivado ignorados: 2; modificación fija:



carbamidometilacion (C); modificación variable: oxidación (M); modo de búsqueda: EM/EM búsqueda de ion con búsqueda en base de datos señuelo incluida; Precursor Mass Tolerance: 10 ppm; Fragment Mass Tolerance: 0.6 Da; Target False Discovery Rate (FDR): 0.01. Así, el análisis generó archivos MSF conteniendo información sobre la intensidad del péptido precursor que luego se procesaron con Scaffold software versión 4.0.4 (Proteome Software Inc., Portland, OR) para su cuantificación. Para filtrar las proteínas con expresión diferencial significativa ( $P < 0.05$ ) se utilizó el t-test.

#### **14) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot para fosfatasa PPP1R12B.**

Se utilizaron músculos Soleo de ambos grupos, control y tratado con BDA-410 para aislar las proteínas citosólicas. Para ello, el tejido se homogeneizó mecánicamente (Tissue Tearor™, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) en buffer RIPA® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) previamente enfriado. El homogenado resultante se centrifugó por 5 minutos a 14000 g en una microcentrífuga a fin de remover los restos insolubles. Luego se midió la concentración de proteína total en el sobrenadante. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se realizó en geles al 10 % utilizando un sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories, Hemel-Hempstead, Herts, UK). Luego, los mismos se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Health, Little Chalfont, Bucks., UK) durante 12 horas a 4°C y se bloquearon en leche libre de grasa al 5% disuelta en buffer TBS (TBS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) y con el agregado de Tween al 0.1%. Finalmente, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios anti-PPP1R12B (Cat # 13366-1-AP, policlonal, Proteintech, Chicago, IL) a una dilución de 1:500 y anti-GAPDH (Cat#GTX627408-01, monoclonal, GeneTex, Irvine, CA) a una dilución de 1:10.000. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa del rábano picante que fueron a su vez detectados mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL plus, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Luego del revelado, las bandas correspondientes a las proteínas se registraron mediante un sistema de obtención de imágenes (Kodak Gel Doc, Carestream Health Inc., Rochester, NY) y posteriormente se cuantificaron utilizando ImageJ (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD).

### **15) Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando Sigma Plot 12.5 (Systat Software, San José, CA) o Prism 6.0a (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). En todos los casos los resultados se presentan como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). El nivel de alfa se estipuló a  $p < 0.05$ . Para comparar grupos experimentales se utilizó Student *t*-test o Análisis de la Varianza (ANOVA) según correspondiera.

## **CAPITULO II.**

**Efecto De La Inhibición Del Sistema De Calpaínas Sobre El  
Peso Corporal, El Contenido Graso Total Y La Interacción  
Músculo Esquelético-Tejido Adiposo En Ratones Gerontes**

## II.A INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS

Además de su reconocido rol en la locomoción, mantenimiento de la postura y generación de calor, el músculo esquelético (ME) se desempeña como un tejido endócrino que regula el metabolismo general del organismo. Ha sido previamente descrito que durante la actividad contráctil basal y en particular durante el ejercicio, el ME sintetiza y libera al líquido extracelular y/o a la circulación general una serie de moléculas de naturaleza proteica que actúan en un modo hormono-símil, denominadas *mioquinas* (ver detalles en *Parte I- Introducción General*).

En la actualidad, se han identificado claramente al menos 20 moléculas que poseen características de mioquinas; sin embargo, un análisis minucioso del secretoma del ME, señala que los mioblastos y miotubulos poseen la capacidad de producir y secretar al menos cientos de factores con potencial actividad endocrina (**Bortoluzzi, Scannapieco, Cestaro, Danieli, & Schiaffino, 2006**). Entre los efectores mejor caracterizados se encuentran IGF-1, IL-6, IL-15, CXCL-1, miostatina, mionectina y proteína similar a la Angiopoyetina-4 (ANGPTL4). La acción mediada por las mismas puede tener carácter autócrino, parácrino o endócrino. Uno de los principales blancos biológicos es la modulación de la interacción (*o crosstalk*) entre el ME y el tejido adiposo con promoción de la lipólisis, reducción de la grasa visceral y aumento de la captación y oxidación de ácidos grasos por los tejidos periféricos (**Raschke & Eckel, 2013**). Así, la actividad muscular podría mejorar el metabolismo lipídico y ejercer un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus, la demencia y algunos tipos de neoplasias (**Pratesi, Tarantini, & Di Bari, 2013**).

Estudios clínico-epidemiológicos señalan que en humanos, la tasa de morbimortalidad de numerosas patologías asociadas al envejecimiento se correlaciona con el estado funcional, la demanda metabólica y la masa muscular (**Anker et al., 1997; Metter, Talbot, Schrager, & Conwit, 2002; Ruiz et al., 2008**). Esto sugiere entonces que el ME posee un rol activo en el proceso de envejecimiento sistémico y podría constituirse como un determinante más de la esperanza de vida de la especie (**Demontis, Piccirillo, Goldberg, & Perrimon, 2013**). Dado la creciente aceptación de las mioquinas como importantes moduladores de la homeostasis metabólica sistémica, es válido suponer que estas podrían actuar también como mediadoras de los cambios multiorgánicos observados durante el envejecimiento. Esta hipótesis se sustenta también en la observación que, en mamíferos, los

niveles de ciertas mioquinas cambian de manera edad-dependiente (**Baumann, Ibebunjo, Grasser, & Paralkar, 2003**).

Además de regular la mortalidad a causa de procesos relacionados con la edad, el ME puede modular la sensibilidad del organismo a estresores endógenos y exógenos. En un modelo de envejecimiento fisiológico en *Drosophila melanogaster* se demostró que intervenciones músculo-específicas pueden no solo retrasar el deterioro asociado a la edad de ese tejido sino mitigar también la declinación funcional sistémica, aumentar la resistencia al estrés, mejorar la homeostasis metabólica y extender la supervivencia (**Demontis & Perrimon, 2010**). El músculo esquelético se posiciona entonces como un órgano centinela que revela tempranamente los efectos deletéreos del envejecimiento sobre él mismo y sobre otros tejidos. Esto lo constituye en un atractivo órgano diana para las intervenciones terapéuticas.

En el capítulo anterior, describimos cómo la administración sistémica de un inhibidor del sistema proteolítico de calpaínas (BDA-410) genera una significativa disminución de la actividad endógena de estas enzimas en el músculo esquelético de ratones C56BL/6 gerontes. La misma se acompaña de un aumento en la fuerza de contracción del músculo Sóleo sin modificación alguna en la masa muscular ni en la composición de miofibras. Allí describimos también como la administración de BDA-410 previene la fragmentación de TnT3, reduce la generación del fragmento deletéreo C-terminal y aumenta por consiguiente la expresión de Cav1.1, fenómenos que podrían constituirse como mecanismos explicatorios de esta mejora en la eficiencia de contracción.

Una observación sorpresiva hacia el final del período experimental fue la significativa pérdida de peso corporal en el grupo tratado con BDA-410 mientras que el grupo control presentó un ligero aumento respecto del peso pre-intervención. Dado que la masa magra, representada por el peso post-mortem de los músculos, se mantuvo invariable y que el estado general de los ratones se correspondía con individuos sanos de 23-meses de edad, decidimos explorar dicho fenómeno y clarificar el mecanismo. Para ello se determinó, antes y después de la intervención, la composición corporal y se evaluaron las variables responsables del peso como actividad física e ingesta calórica. Finalmente, se analizó el perfil transcripcional del músculo esquelético de ambos grupos experimentales para determinar la presencia o ausencia de cambios a nivel de la expresión de genes involucrados en la regulación del metabolismo.

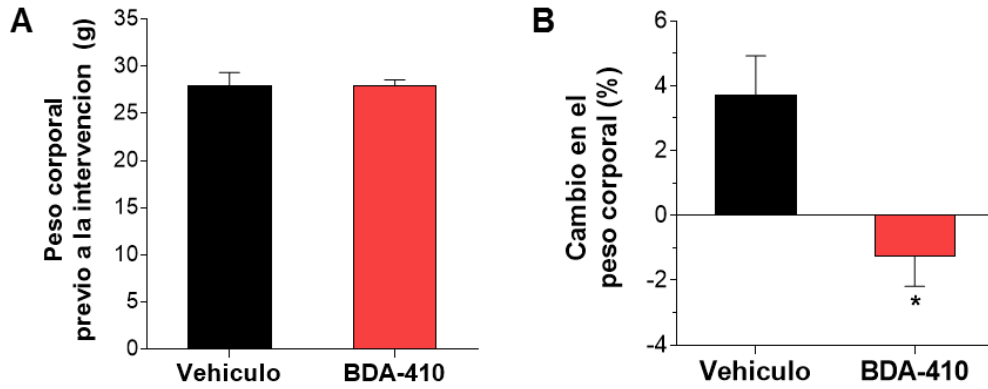
*Así, nos propusimos investigar (1) los mecanismos subyacentes a la pérdida de peso observada en los ratones C57BL/6 de 23 meses de edad luego de la administración de BDA-410 y (2) si existía una asociación causal entre este fenómeno y la inhibición de las calpaínas en el músculo esquelético.*

## II.B RESULTADOS

Dos grupos o cohortes de ratones C57BL/6 hembra de 23 meses de edad fueron tratados vía oral, diariamente y durante 21 días con una solución vehículo (Tween 80® al 1% en NaCl 0.09%) o una suspensión del inhibidor de calpaínas BDA-410 (disuelto en vehículo), correspondiendo al grupo control o grupo experimental, respectivamente. La administración se realizó por vía oral a una dosis de 30 mg/kg/día en un volumen equivalente a 10 ml/kg. Una vez finalizada la intervención se procedió a analizar una serie de variables relacionadas con el metabolismo energético del músculo esquelético sarcopénico y su rol como órgano regulador del metabolismo sistémico. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

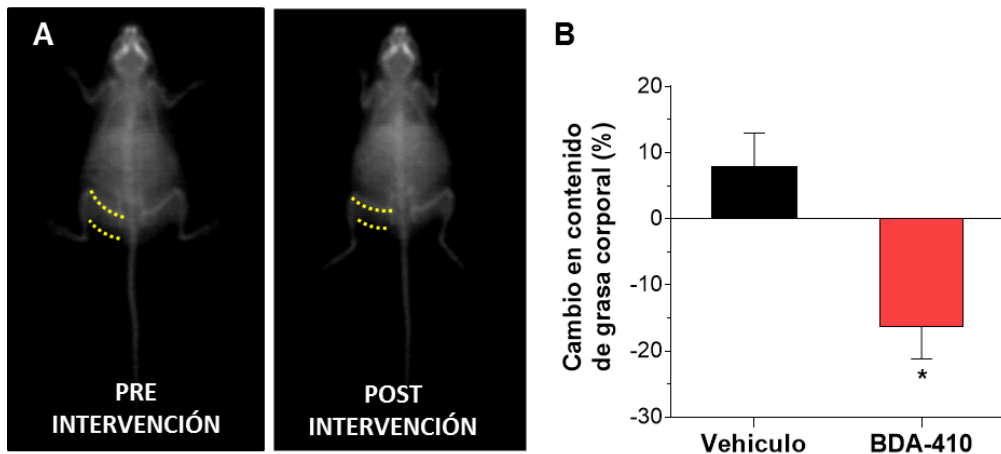
### ***II.B.1. El peso y el contenido de grasa corporal disminuyen luego de la administración de BDA-410 en ratones C57BL/6 gerontes.***

Durante toda la duración del experimento, los animales se mantuvieron en una dieta regular de alimento balanceado para roedores de laboratorio y sus pesos se registraron antes y después de la intervención terapéutica. El porcentaje de pérdida o ganancia de peso corporal fue calculado como se describe en la sección *Materiales y Métodos* de este capítulo. Es importante señalar que ambos grupos presentaron un peso corporal promedio similar al comienzo del experimento, siendo el mismo de  $27.84 \pm 1.5$  gr para el grupo control y de  $27.9 \pm 0.66$  gr para el experimental (**Figura II.B.1A**;  $p=0.968$ ). Una vez finalizado el periodo de intervención experimental, el grupo de animales tratados con el inhibidor de calpaínas BDA-410 mostró una reducción del peso corporal del 1.25% mientras que el grupo control registró una ganancia del 5.15% (**Figura II.B.1B**;  $p=0.005$ ).



**Figura II.B.1. Efecto de la administración de BDA-410 sobre el peso corporal.** El peso de los ratones C57BL/6 gerontes se registró antes (A) y después de la administración de solución vehículo o BDA-410 por tres semanas y se calculó el porcentaje de pérdida o ganancia (B). En (A) y (B)  $n=8$  para grupo control y  $n=9$  para BDA-410;  $*p=0.005$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

El contenido de grasa corporal se evaluó mediante densitometría de energía dual de rayos-X, comúnmente llamado DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) (Figura II.B.2A) y a continuación se calculó el porcentaje de cambio en el mismo luego de la intervención tal como se señala en el apartado metodológico.

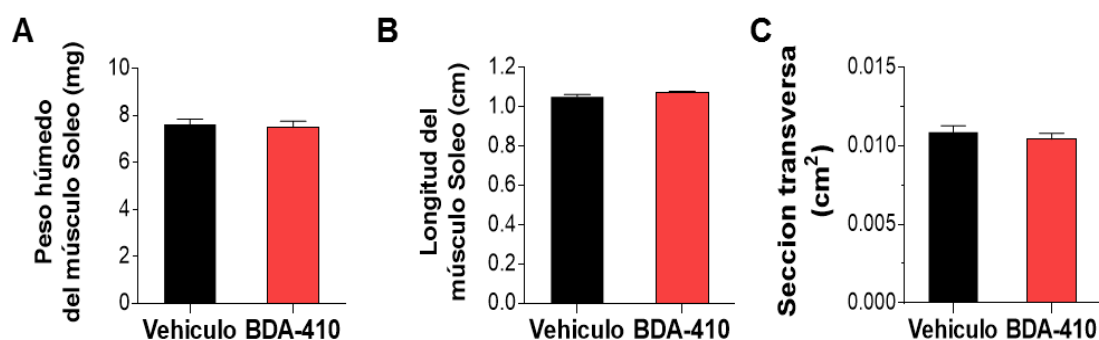


**Figura II.B.2. Efecto de la administración de BDA-410 sobre la composición corporal.** El contenido de grasa corporal se evaluó mediante DEXA. En (A) se muestran las imágenes de rayos X obtenidas antes y después de la administración de BDA-410 en un individuo que redujo su grasa corporal en un 28%. Luego se calculó el porcentaje de cambio relacionado con la intervención terapéutica (B). En (B),  $*p=0.021$  y  $n=4$  para ambos grupos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.



Como puede observarse en la **figura II.B.2B**, luego del tratamiento con BDA-410, los ratones hembra C57 de 23 meses de edad sufrieron una reducción significativa del contenido de grasa corporal de aproximadamente el 16 % del valor pre-intervención mientras que los animales tratados con solución vehículo mostraron una ganancia de aproximadamente el 8% ( $p=0.021$ ).

Como medida representativa de la masa corporal magra, una vez finalizada la intervención se colectaron los músculos Soleo y se registraron su peso y su longitud de reposo a fin de calcular la sección transversa como medida normalizada de su tamaño. La comparación entre el grupo control y el grupo experimental no arrojó diferencia alguna entre estos parámetros (**Figura II.B.3A, B y C**).



**Figura II.B.3. Efecto de la administración de BDA-410 sobre la masa muscular.** Cuantificación del peso húmedo (A), longitud de reposo (B) y sección transversa (C) del músculo Soleo como representante de la masa magra.  $n=6$  para ambos grupos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

Cuando considerados en conjunto, estos resultados sugieren que la reducción en el peso corporal observada luego de la administración de BDA-410 se debería inicialmente a la pérdida significativa de grasa corporal.

### ***II.B.2. La ingesta calórica e hídrica no se modifica luego de la administración de BDA-410.***

A continuación se realizaron diversas mediciones para tratar de explicar las variaciones en peso y grasa corporal registradas luego de la intervención experimental con

el inhibidor de calpaínas BDA-410. Así, se examinó la ingesta diaria de alimento y agua de cada uno de los individuos en ambos grupos durante 3 días consecutivos, tanto antes como después de la intervención experimental.

La **figura II.B.4A** muestra que el grupo control registró una ingesta de alimento diaria promedio pre y post intervención de  $3.74\pm 0.16$  y  $3.96\pm 0.36$  gr/día respectivamente, mientras que los valores para el grupo tratado con BDA-410 fueron de  $4.32\pm 0.19$  y  $3.83\pm 0.22$  gr/día. La ingesta diaria promedio de agua pre y post intervención (**figura II.B.4B**) para el grupo control fue de  $6.08\pm 0.68$  y  $7.33\pm 0.61$  mL/día respectivamente mientras que los valores para el grupo tratado con BDA-410 fueron de  $7.20\pm 0.48$  y  $6.60\pm 0.78$  mL/día. La comparación estadística no registró diferencias significativas en la ingesta de comida ( $p=0.42$  grupo control y  $p=0.10$  grupo BDA-410) o agua ( $p=0.09$  grupo control y  $p=0.17$  grupo BDA-410) para cada grupo luego del tratamiento.

A continuación, los valores de ingesta diaria fueron normalizados por el peso corporal que cada individuo registró al momento de la medición. Su posterior análisis tampoco reveló diferencias significativas pre y post administración de vehículo ( $p=0.53$  para ingesta de alimento;  $p=0.21$  para ingesta de agua) o de BDA-410 ( $p=0.07$  para ingesta de alimento;  $p=0.15$  para ingesta de agua) (**figura II.B.4C y D**).

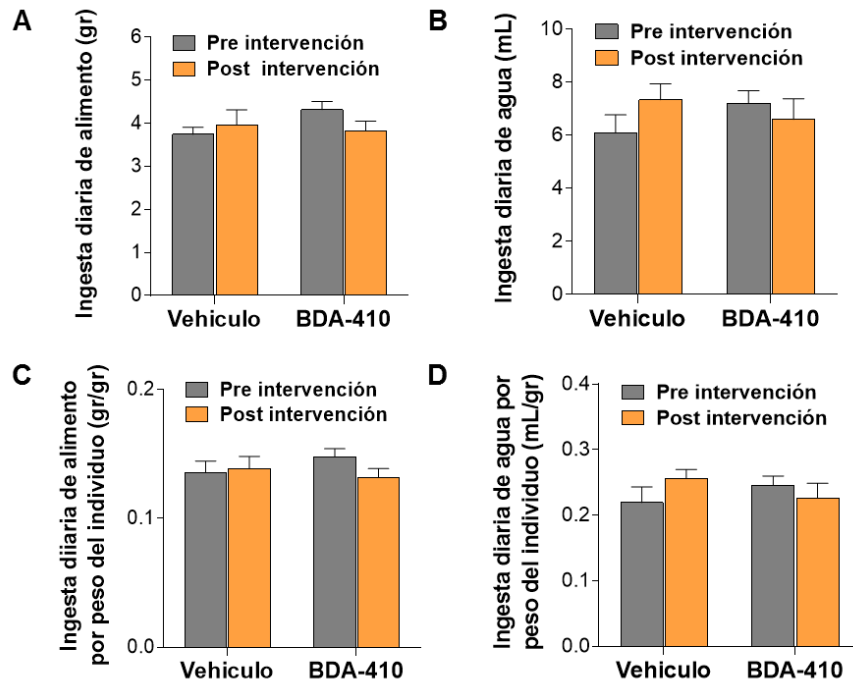
Estos resultados indican que la ingesta calórica e hídrica no se modifica por la administración de BDA-410 y por lo tanto esta variable no participaría del descenso de peso y pérdida de grasa corporal observado en los ratones C57BL/6 gerontes.

### ***II.B.3. La administración de BDA-410 no modifica la actividad locomotriz espontánea en ratones C57BL/6 gerontes.***

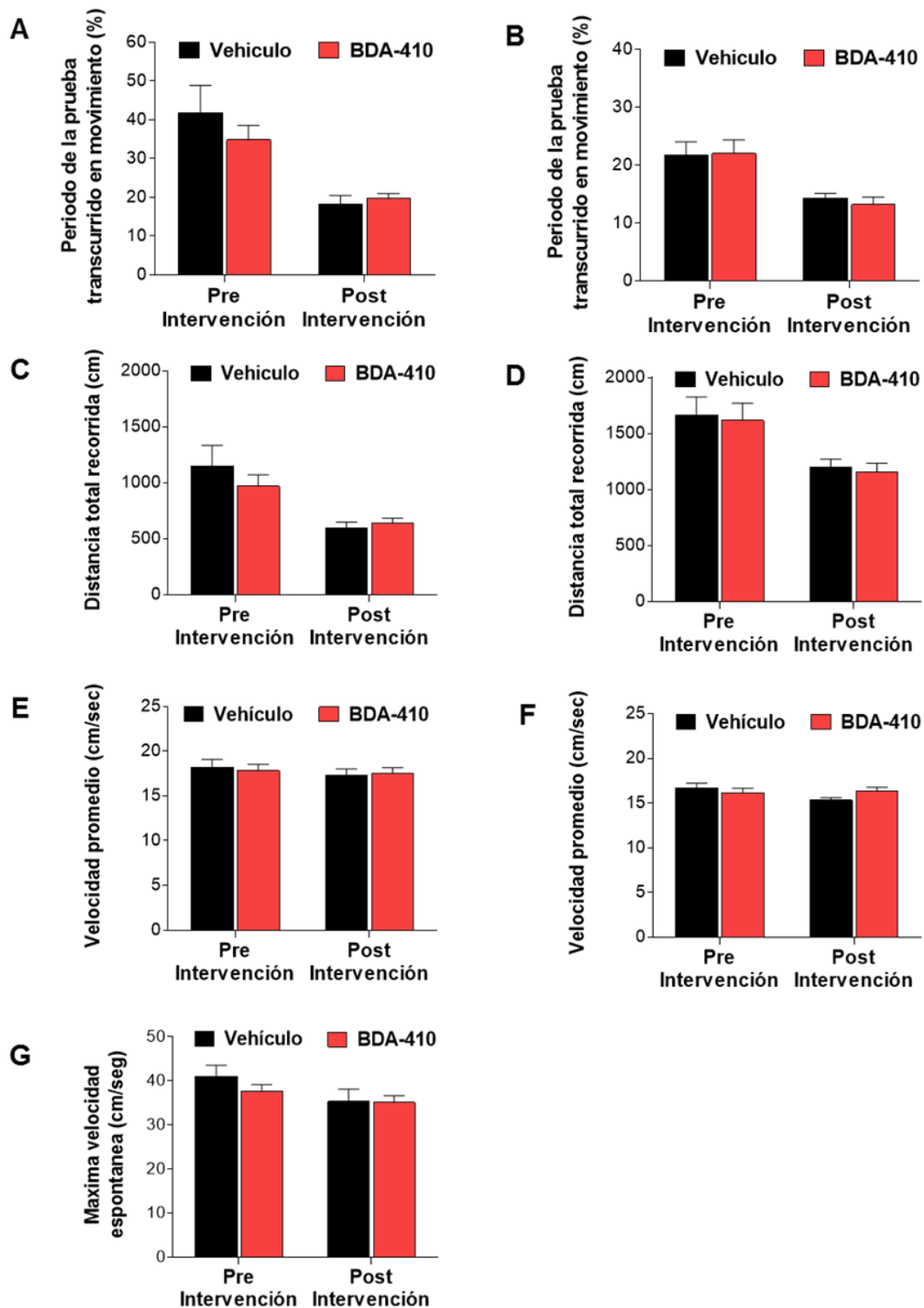
Otro fenómeno que puede ser responsable de generar un fenotipo delgado es el incremento de la actividad física espontánea. Por ello, decidimos evaluar si la administración de BDA-410 podría afectar la frecuencia, intensidad o duración de la actividad locomotriz espontánea en los ratones C57BL/6 de 23 meses de edad. Todos los individuos tanto del grupo control como experimental fueron evaluados antes y después de la intervención terapéutica en un dispositivo de tipo “campo abierto”, por un máximo de 5 minutos en ausencia y presencia de un objeto inanimado (ver Materiales y Métodos para detalles del

procedimiento). Como se muestra en la **figura II.B.5**, la comparación entre ambos grupos no muestra diferencias significativas en el tiempo del ensayo que los animales pasan en movimiento (**fig. II.B.5A y B**), la distancia total recorrida (**fig. II.B.5C y D**), la velocidad promedio (**fig. II.B.5E y F**) y la velocidad espontánea máxima (**fig. II.B.5G**).

Estos resultados indican que la actividad física espontánea no se modificó por la administración de BDA-410 y por lo tanto esta variable no participaría del descenso de peso y pérdida de grasa corporal observado en los ratones C57BL/6 gerontes.



**Figura II.B.4. Efecto de la administración de BDA-410 sobre la ingesta de agua y comida.** Para cada individuo se registró la ingesta de comida (A; gr/día) y agua (B; mL/día) durante 3 días consecutivos tanto antes como después de la administración de vehículo o BDA-410. Los valores obtenidos se normalizaron luego por el peso corporal del individuo al momento del registro (C y D). En (A, B, C y D) n=4 para grupo control y n=5 para BDA-410. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

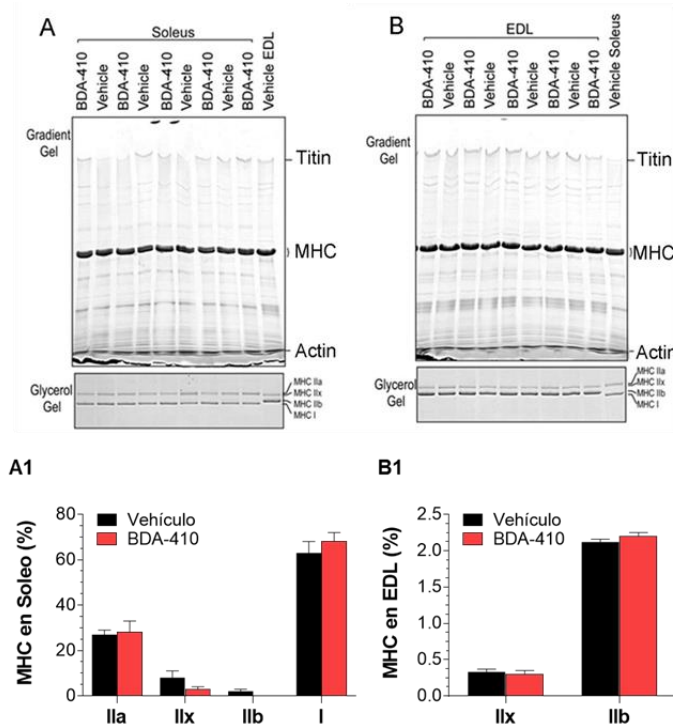


**Figura II.B.5. Efecto de la administración de BDA-410 sobre la actividad locomotriz espontánea.** Se registró la actividad locomotriz espontánea de los ratones C57BL/6 antes y después de la intervención experimental. Se evaluaron los siguientes parámetros en ausencia y presencia de un objeto inanimado respectivamente: (A y B) porcentaje del tiempo de la prueba que el individuo pasa en movimiento; (C y D) distancia total recorrida, (E y F) velocidad promedio, (G) velocidad máxima. En todos los casos n=4 para el grupo control y n=5 para el grupo con BDA-410. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

**II.B.4. La composición miofibrilar de músculos rápidos y lentos no se modifica luego de la administración de BDA-410 en ratones C57BL/6 gerontes.**

Ha sido ampliamente descrito que las fibras musculares rápidas y lentas presentan vías de utilización del combustible únicas y diferenciales que a su vez influyen en el metabolismo energético global del músculo como órgano y eventualmente del organismo en su conjunto.

Como parte de nuestro estudio sobre las causas de la pérdida de peso y grasa corporal en ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410, evaluamos también posibles cambios en la composición miofibrilar de los músculos al finalizar la intervención terapéutica. Para ello se identificaron y cuantificaron las distintas isoformas de la Cadena Pesada de Miosina (MHC) en un músculo tradicionalmente rápido como el EDL y en otro de composición mixta a predominio de fibras lentas como el músculo Soleo. Tal como se señala en el Capítulo I, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de las isoformas de MHC entre el grupo control y el grupo tratado con BDA-410 para ambos músculos (**figura II.B.6**).



**Figura II.B.6. Efecto de la administración de BDA-410 sobre la composición fibrilar en los músculos Soleo y EDL.** Se identificaron y cuantificaron los niveles de las distintas isoformas de la cadena pesada de miosina (MHC tipo IIa, IIx, IIb y I) en los músculos Soleo (**A** y **A1**) y EDL (**B** y **B1**) aislados de individuos tratados con vehículo (n=4) y BDA-410 (n=5). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

### ***II.B.5. Genes involucrados en la captación, procesamiento y oxidación de los ácidos grasos se encuentran sobre expresados en músculo esquelético luego de la administración de BDA-410.***

Dado que no se registraron cambios significativos en la ingesta calórica, en la actividad locomotriz ni en la composición miofibrilar que pudieran explicar el descenso de peso y la pérdida de grasa corporal de los ratones gerontes tratados con BDA-410, decidimos analizar el perfil de expresión de genes claves en el metabolismo energético y en la conversación cruzada (crosstalk) músculo-tejido adiposo.

Para ello realizamos un análisis del conjunto de genes transcripcionalmente activos (transcriptoma) en el músculo Gastrocnemio al finalizar la administración de solución vehículo o BDA-410 tal como se describe a continuación. Brevemente, luego de la eutanasia se colectaron los músculos de cada individuo, se extrajo el ARN mensajero y luego se retro-transcribió a ADNc para ser finalmente analizado mediante la tecnología del microarray (para más detalles ver apartado metodológico en este capítulo).

El análisis estadístico de los datos obtenidos reveló, en el grupo tratado con BDA-410, unos 2559 transcritos diferencialmente expresados de manera significativa ( $p < 0.05$ ) y con un rango de expresión entre -2.05 y 9.85 veces respecto del grupo control ( $=\log_2(\text{ratio de expresión})$ ; *fold change*). De éstos, 1241 genes se encontraron sobre-expresados (1.02 a 9.84 veces) y 1318 sub-expresados (-1.02 a -2.05 veces). En la **figura II.B.7** (grafico de volcán) se muestra la distribución general de estos transcritos en función de la significancia (eje Y, *p-value*) y la magnitud del cambio (eje X, *diferencia entre medias*).

El análisis ontológico de los 106 genes que presentaron un nivel de cambio (*fold change*)  $> 1.5$  veces, reveló un agrupamiento de los mismos centrado principalmente en los siguientes procesos biológicos: metabolismo lipídico, vía de señalización PPAR-Adiponectina, vía de señalización del Factor de Crecimiento Insulino-símil 1 y respuesta al stress oxidativo (**figura II.B.8**).

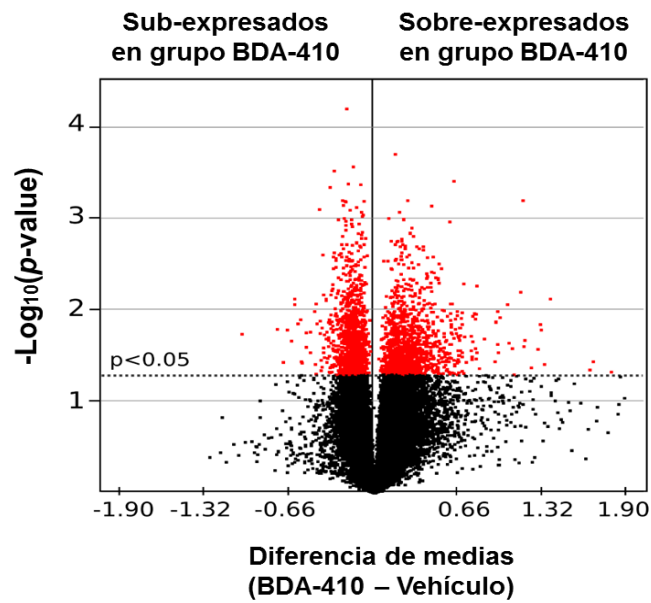
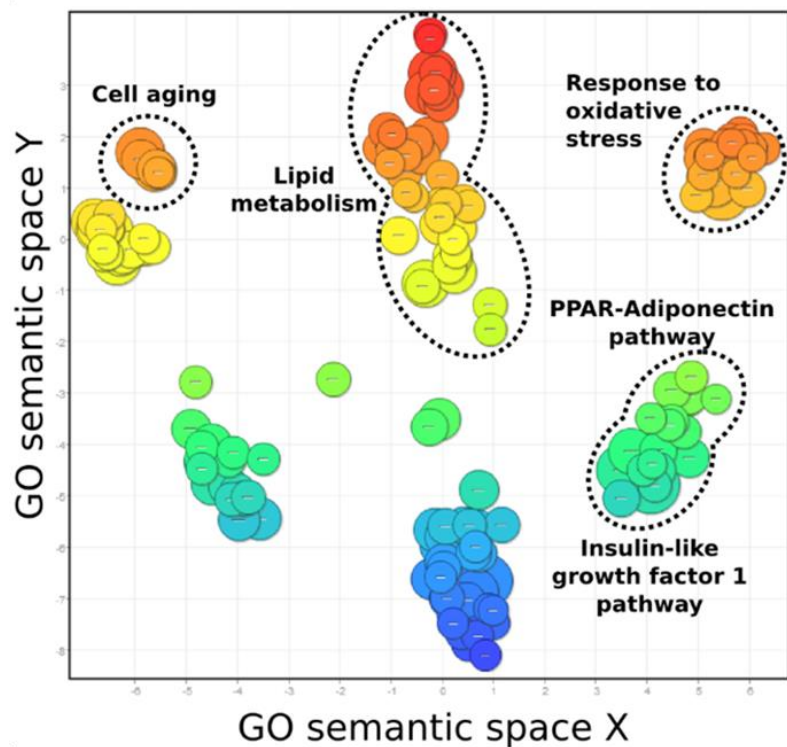


Figura II.B.7. Gráfico de Volcán para los transcritos diferencialmente expresados en el músculo Gastrocnemio de animales control (vehículo) y tratados con BDA-410. Cada punto representa un transcrito. Los puntos en color rojo representan aquellos que demostraron una significancia estadística alta (eje Y;  $p < 0.05$ ). El eje X muestra la diferencia entre las medias como una medida representativa de la magnitud de cambio en la expresión de transcritos en grupo BDA-410 ( $n=4$ ) cuando comparado con el grupo control ( $n=4$ ).

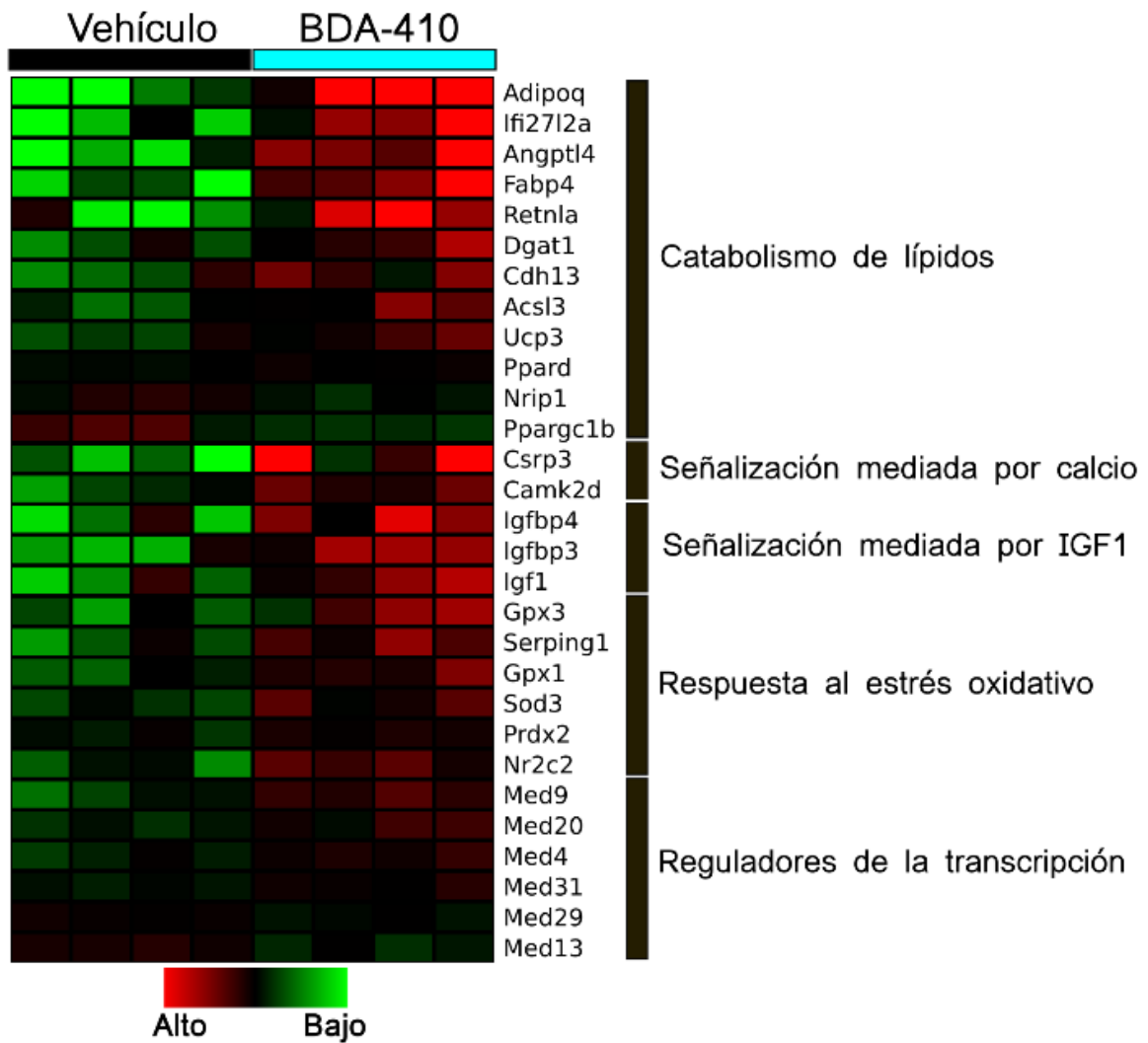
Figura II.B.8. Análisis ontológico de la expresión diferencial de genes en músculo esquelético luego de la administración de BDA-410. Diagrama de dispersión o scatter-plot generado en la plataforma online InnateDB que muestra el agrupamiento ontológico significativo ( $p < 0.05$ ) de los genes diferencialmente expresados ( $>1.5$  veces) en el músculo Gastrocnemio de individuos control ( $n=4$ ) y tratados con BDA-410 ( $n=4$ ). Se resaltan los agrupamientos (clusters) más significativos en función de los cambios observados en los individuos (*Cell Aging*: envejecimiento celular; *Lipid metabolism*: metabolismo lipídico; *PPAR-Adiponectin pathway*: vía del PPAR-Adiponectina; *Insulin-like growth factor 1 pathway*: vía del factor de crecimiento insulino-simil 1; *Response to oxidative stress*: respuesta al estrés oxidativo).



A fin de identificar las vías moleculares específicas involucradas en dichos procesos y que fueran potencialmente afectadas por la administración de BDA-410, realizamos un relevamiento manual de genes con significancia funcional entre aquellos diferencialmente expresados. El resultado de dicha selección se muestra en la **figura II.B.9** (mapa de calor) y en la **Tabla II.B.1**. Entre los genes más sobre-expresados se encontraron *Adipoq*, *Ifi27l2a*, *Angptl4*, *Fabp4*, *Retnla*, *Dgat1*, *Cdh13*, *Acsl3* y *Ppard*. Los mismos codifican para Adiponectina (AdipoQ), proteína similar a la proteína inducida por interferones IFI27/adipocitoquina inducible por interferón (IFI27L2A), proteína similar a Angiopoyetina 4 (ANGPTL4), proteína ligadora de ácidos grasos 4 (FABP4), proteína alfa similar a resistina (RETNLA), diacilglicerol O-aciltransferasa (DGAT1), cadherina T, acil-CoA sintetasa para ácidos grasos de cadena larga y receptor delta activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPARD) respectivamente.

Tal como se señalara en la introducción, dentro del músculo esquelético los productos de estos genes forman parte de una vía de señalización liderada por el PPARD, la proteína similar a Angiopoyetina 4 y la Adiponectina y actúan concertadamente para regular el metabolismo energético local y de otros órganos como el tejido adiposo. Adicionalmente, conocidos moduladores negativos de esta vía metabólica como *Nrip1* (proteína que interacciona con el receptor nuclear 1 o RIP140) y *Ppargc1* (coactivador 1 $\beta$  del receptor gamma activado por el Factor Proliferador de Peroxisomas, PGC-1 $\beta$ ) se encontraron sub-expresados luego de la administración de BDA-410 contribuyendo de esa manera al aumento en la transcripción del gen de *Ppard* e indirectamente, a continuación, de sus efectores.





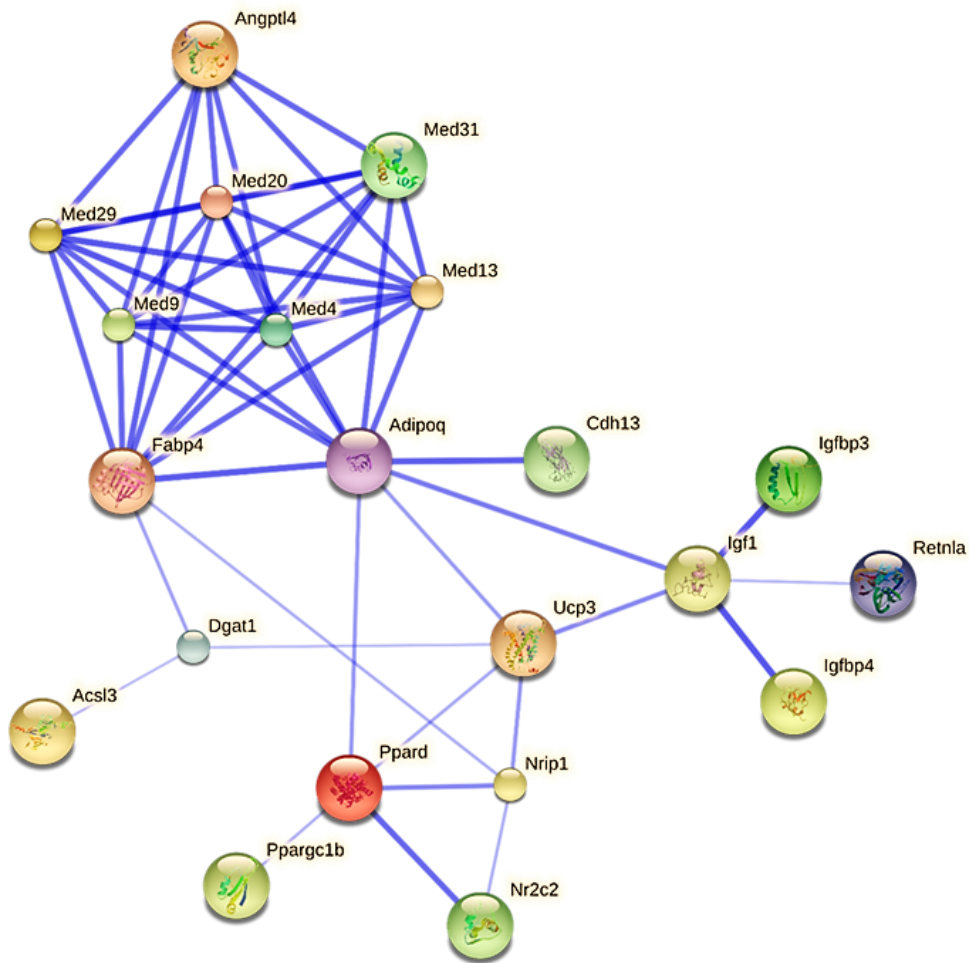
**Figura II.B.9. Expresión diferencial de genes involucrados el metabolismo lipídico muscular, la señalización entre músculo-grasa y procesos relacionados.** Mapa de calor que muestra, para ambos grupos experimentales (vehículo y BDA-410), el nivel de expresión de un grupo de genes (>1.0 veces y  $p < 0.05$ ) seleccionados según su relevancia en los procesos biológicos señalados en el análisis ontológico (Figura II.7). En verde se muestran los genes que en el grupo BDA-410 se encontraban sub-expresados respecto del grupo control mientras que en rojo lo hacen los genes que en el grupo BDA-410 se encontraban sobre-expresados respecto del grupo que recibió solución vehículo.

<b>Símbolo del Gen</b>	<b>Título del Gen</b>	<b>Cambio (número de veces)</b>	<b>P</b>
<b><i>Lipólisis – Incorporación, manejo y oxidación de lípidos</i></b>			
<b>Adipoq</b>	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	9.85	0.023
<b>Ifi2712a</b>	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	3.20	0.045
<b>Angptl4</b>	angiopoietin-like 4	2.59	0.007
<b>Fabp4</b>	fatty acid binding protein 4, adipocyte	2.46	0.016
<b>Retnla</b>	resistin-like alpha	2.25	0.021
<b>Dgat1</b>	diacylglycerol O-acyltransferase 1	1.45	0.041
<b>Cdh13</b>	cadherin 13 (or T-Cadherin protein)	1.45	0.049
<b>Acs13</b>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	1.37	0.040
<b>Ucp3</b>	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	1.28	0.040
<b>Ppard</b>	peroxisome proliferator activator receptor delta	1.04	0.020
<b>Nrip1</b>	nuclear receptor interacting protein 1 (or RIP140)	-1.12	0.041
<b>Ppargc1b</b>	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	-1.29	0.033
<b><i>Vías de señalización del Calcio</i></b>			
<b>Camk2d</b>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	1.46	0.018
<b><i>Reguladores de la Transcripción</i></b>			
<b>Nr2c2</b>	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	1.42	0.022
<b>Med9</b>	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 9 homolog (yeast)	1.33	0.015
<b>Med20</b>	mediator complex subunit 20	1.20	0.030
<b>Med4</b>	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 4 homolog (yeast)	1.16	0.016
<b>Med31</b>	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 31 homolog (yeast)	1.10	0.015
<b>Med29</b>	mediator complex subunit 29	-1.06	0.020
<b>Med13</b>	mediator complex subunit 13	-1.15	0.020
<b><i>Señalización con IGF-1</i></b>			
<b>Igf1</b>	insulin-like growth factor 1	1.70	0.034
<b>Igfbp3</b>	insulin-like growth factor binding protein 3	1.94	0.010
<b>Igfbp4</b>	insulin-like growth factor binding protein 4	1.95	0.023
<b><i>Proteínas asociadas al sarcómero</i></b>			
<b>Csrp3</b>	Cysteine and glycine-rich protein 3/muscle LIM protein	2.50	0.038
<b>Gsn</b>	gelsolin	1.53	0.034
<b><i>Respuesta anti-oxidante</i></b>			
<b>Gpx3</b>	glutathione peroxidase 3	1.54	0.040
<b>Serp1g1</b>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clase G, member 1	1.51	0.017

<b>Nr2c2</b>	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2 (or TR4 receptor)	1.42	0.022
<b>Gpx1</b>	glutathione peroxidase 1	1.35	0.022
<b>Sod3</b>	superoxide dismutase 3, extracellular	1.31	0.017
<b>Prdx2</b>	peroxiredoxin 2	1.12	0.042

**Tabla II.B.1. Selección de genes sobre- y sub-expresados en el músculo Gastrocnemio de ratones C57BL/6 de 23 meses de edad luego de la administración de BDA-410.** La presente tabla detalla la información experimental obtenida sobre un grupo de genes diferencialmente expresados en el grupo tratado con BDA-410 y seleccionados en función del agrupamiento ontológico y relevancia para el fenómeno biológico en estudio.

A fin de analizar el grado de relación funcional entre los genes diferencialmente expresados en el músculo esquelético luego de la administración de BDA-410 se confeccionó una red de interacciones proteína-proteína (**figura II.B.10**) utilizando una herramienta on-line denominada STRING<sub>10</sub><sup>®</sup> (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins). Para ello se utilizó una lista de 24 genes identificados como cruciales en el metabolismo lipídico del músculo y la función de este como órgano endocrino-paracrino. Las fuertes asociaciones que se muestran en la red están basadas en información disponible sobre co-expresión, co-ocurrencia, repositorios de datos experimentales, minería de textos, etc. que el programa utiliza como bases de datos para realizar las inferencias.



**Figura II.B.10. Red de interacciones proteína-proteína involucradas en el metabolismo lipídico muscular, la señalización entre músculo-grasa y procesos relacionados.** Representación automatizada (String10 software) de la relación física y funcional (líneas azules) descrita entre los productos de 24 genes (nodos) diferencialmente expresados en el músculo esquelético de ratones tratados con BDA-410 respecto de los individuos control. La fuerza de la asociación es proporcional al grosor de las líneas que conectan los nodos y cada nodo lleva el nombre de la proteína a la cual representa.

***II.B.6. Los genes de mioquinas mediadoras de la lipólisis se sobre-expresan en el músculo esquelético luego de la administración de BDA-410.***

Independientemente del nivel de actividad física y de su estado metabólico, el músculo esquelético tiene un impacto significativo en la homeostasis metabólica del organismo en su totalidad, principalmente mediante la producción y secreción de moléculas con función paracrina-endocrina denominadas mioquinas.

En nuestro modelo experimental identificamos, luego de la administración de BDA-410, la sobre-expresión significativa en músculo esquelético de los genes correspondientes a 4 moléculas con actividad citoquina, a saber: *Adipoq* (+9.85 veces; p=0.023), *Ifi2712a* (+3.20 veces; p=0.045), *Angptl4* (+2.59 veces; 0.007), *Fabp4* (+2.46 veces; p=0.016) y *Retnla* (+2.25 veces; p=0.021) (**figura II.B.9 y tabla II.B.1.**). Como se discutirá luego, estas moléculas actúan como reguladoras positivas de la lipólisis e inhibidoras de la maduración/diferenciación de los adipocitos por lo que su sobre-expresión podría contribuir al fenotipo observado en nuestros ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración del inhibidor de calpaínas.

***II.B.7. Genes asociados a un fenotipo corporal delgado se encuentran sobre-expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410.***

En los últimos 10 años se han identificado ciertos genes cuya expresión músculo-específica se asocia positivamente a un fenotipo corporal delgado con reducción del contenido de grasa total. La mayoría de ellos codifican para proteínas involucradas en el metabolismo lipídico, la termogénesis y la comunicación cruzada entre el músculo y otros tejidos (**Clapham et al., 2000; Fruebis et al., 2001; Liu et al., 2009; Y. X. Wang et al., 2003**).

En nuestro caso, la comparación entre los animales tratados con solución vehículo y con BDA-410 reveló que los genes *Adipoq*, *Ucp3*, *Dgat1* y *Ppard* se encontraban significativamente sobre-expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 tratados con el inhibidor de calpaínas BDA-410 (**figura II.B.9 y tabla II.1.**). Tal como se discutirá luego, numerosos reportes los indican como genes moduladores del peso y grasa corporal.

***II.B.8. Genes asociados al aparato contráctil y su regulación se encuentran diferencialmente expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410.***

Luego de la inhibición del sistema de calpaínas en el músculo esquelético de los ratones de 23 meses de edad se observó una expresión diferencial significativa (**tabla II.B.1**)

en la transcripción de genes involucrados en: (1) la homeostasis del calcio citosólico y del acoplamiento excito-contráctil como *Camk2d* (quinasa IId dependiente de calcio/calmodulina; +1.46 veces; p=0.018), *Csrp3* (proteína rica en cisteína y glicina 3/proteína LIM; +2.50 veces; p=0.038) y *Dnm2* (dinamina-2; -1.07 veces; p=0.038); (2) la dinámica de los filamentos de actina como *Gsn* (gelsolina; +1.53 veces; p=0.034) y (3) la regulación estructural y funcional de la unidad motora como como *Igfl* (factor de crecimiento insulino similar, +1.70 veces; p=0.034), *Igfbp3* (+1.94 veces; p=0.010), *Igfbp4* (+1.95 veces; p=0.023) y *Creb3* (+1.11 veces; p=0.030).

***II.B.9. Genes asociados a factores moduladores de la transcripción se encuentran diferencialmente expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410.***

Como fuera descripto previamente, la expresión regulada y coordinada de los diversos genes involucrados en un proceso biológico determinado requiere de la participación de factores que modulen la temporalidad y frecuencia de la transcripción del ADN.

En los animales tratados con BDA-410 el análisis del transcriptoma (**tabla II.B.1**) reveló la sobre-expresión de un grupo de factores pertenecientes al complejo modulador de la transcripción denominado *Mediator* (MED) como Med4, Med9, Med20 y Med31. El gen que codifica para el receptor nuclear huérfano Nr2c2 también se encontró sobre expresado mientras que los factores Med13, Med29, Nrip1 y Ppargc1b mostraron un nivel inferior de expresión en el grupo tratado con BDA-410 respecto del grupo control. Tal como se discutirá más adelante, todos estos factores han sido reportados como moduladores de la expresión de *Ppard*, *Angptl4* y *Adipoq* entre otros.

***II.B.10. Genes asociados a la respuesta al estrés oxidativo se encuentran sobre-expresados en el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes luego de la administración de BDA-410.***

Otro grupo de genes de importancia surgido del análisis ontológico del transcriptoma es aquel conformado por elementos de protección contra el estrés oxidativo. Así, el grupo de ratones tratados con el inhibidor de calpaínas BDA-410 mostró sobre-expresión significativa de *Gpx3*, *Serping1*, *Gpx1*, *Sod3* y *Prdx2* (**tabla II.B.1**) respecto del grupo control. Las proteínas codificadas dichos genes cumplen funciones anti-oxidantes en la fisiología celular, tal como se discutirá más adelante.

## II.C DISCUSIÓN

En el capítulo anterior describimos como la inhibición del sistema proteolítico de calpaínas en el músculo esquelético de ratones C56BL/6 gerontes se asocia a un aumento en la fuerza de contracción del músculo Sóleo sin modificación alguna en la masa muscular ni en la composición de miofibras. Allí demostramos que dicho incremento en la eficiencia contráctil responde, al menos en parte, a una disminución en la fragmentación de TnT3, con consiguiente reducción de la presencia del fragmento deletéreo C-terminal y aumento de la expresión del canal de calcio del sarcolema,  $Ca_v1.1$ . También reportamos una disminución en la proteína reguladora de la fosfatasa de miosina PPP1R12B que podría contribuir a aumentar la sensibilidad del aparato contráctil al  $Ca^{+2}$  citosólico.

Los determinantes de la tensión generada por un músculo dado durante la contracción pueden responder a factores estructurales, neurales, hormonales y metabólicos. A su vez, el estado nutricional general, el metabolismo energético del tejido muscular, el peso y la composición corporal en relación a la distribución masa magra/masa grasa son factores importante que pueden influir en la eficiencia de la contracción muscular.

Dado que en un ensayo preliminar observamos que los ratones gerontes tratados con BDA-410 experimentaron pérdida de peso corporal respecto del valor pre-intervención, nos propusimos clarificar el mecanismo subyacente y determinar la relevancia o participación de este fenómeno en el incremento de la fuerza contráctil descrito previamente. Comenzamos por evaluar el peso y la composición corporal en ambos grupos, antes y después de la intervención. Confirmamos así que el grupo tratado con BDA-410 presentó una reducción significativa de peso corporal del 1.25% respecto del peso inicial mientras que el grupo control registró una ganancia del 5.15%. El análisis de las imágenes obtenidas por densitometría de energía dual de rayos-X reveló además que la administración durante 3 semanas del inhibidor de calpaínas BDA-410 produjo una disminución significativa en el contenido de grasa corporal de aproximadamente el 16% del valor pre-intervención. Contrariamente, los animales tratados con solución vehículo evidenciaron un ligero aumento de dicha variable de alrededor del 8%. Por otra parte, el peso post-mortem de los músculos esqueléticos no registró diferencia alguna entre ambos grupos como así tampoco el tamaño de las principales vísceras toraco-abdominales. Estos resultados sugieren entonces que el



descenso de peso luego de la administración de BDA-410 responde a la pérdida de grasa corporal sin cambios en la masa magra.

Continuando con nuestro análisis de la mecánica del fenómeno observado decidimos evaluar los principales determinantes del peso y composición corporal como ingesta calórica y actividad física espontánea. El análisis de los datos respecto de la ingesta hídrica y calórica diaria, la distancia recorrida en un dispositivo de tipo “campo abierto”, la velocidad máxima desarrollada y el tiempo que el animal se mantuvo en movimiento no arrojó diferencias significativas pre- y post-intervención entre los dos grupos por lo que estas variables no pueden ser sindicadas como responsables de la reducción en peso y grasa corporal observada.

Ha sido ampliamente descripto que el músculo esquelético se constituye también como un órgano de tipo endócrino, secretando factores denominados genéricamente mioquinas que regulan el metabolismo del propio tejido y del organismo en general. Estas moléculas parecen estar involucradas también en la progresión de enfermedades relacionadas con la edad y en el proceso de envejecimiento sistémico (**Demontis et al., 2013**). En condiciones fisiológicas, una de las principales funciones biológicas es la modulación de la interacción (*o crosstalk*) entre el músculo esquelético y el tejido adiposo promoviendo la lipólisis, reduciendo la grasa visceral y aumentando la captación y oxidación de ácidos grasos por los tejidos periféricos (**Raschke & Eckel, 2013**). En nuestro modelo, la evaluación del transcriptoma del músculo esquelético luego de la intervención experimental demostró que la administración de BDA-410, y consiguiente inhibición del sistema de calpaínas, altera profundamente el perfil de expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico y la síntesis de citoquinas moduladoras de la homeostasis energética (**figura II.C.1**).

La significativa sobre-expresión de genes como *Ppard*, *Angptl4*, *Adipoq*, *Ifi27i2a* y *Retnla*, entre otros, señala que el músculo esquelético de los animales tratados con BDA-410 parece modular la fisiología del tejido adiposo mediante la estimulación de la lipólisis e inhibición de la adipogénesis. A continuación se realiza una descripción detallada aunque no acabada de esta compleja red de interacciones entre genes, proteínas y tejidos a fin de brindar el marco teórico necesario para la interpretación de nuestros resultados.



Por otra parte, el propio PPAR $\delta$  está regulado a nivel transcripcional por factores miembros del *Complejo Mediador* (Mediator Complex) y por otras proteínas reguladoras como el co-represor nuclear NRIP1 (o RIP140) y el co-activador PPARGC1B (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\beta$ ). El Complejo Mediador se constituye de al menos 30 subunidades (MED1 a MED31) que interactúan con la ARN polimerasa II y con otros factores de transcripción regulando así la expresión de genes vinculados al metabolismo lipídico (**Belakavadi & Fondell, 2006**). El regulador negativo NRIP1 suele ser particularmente abundante en músculos considerados “rápidos” como el EDL y el Gastrocnemio y su ausencia experimental potencia diversas vías metabólicas que normalmente se encuentran bajo la regulación de PPAR $\delta$  como la incorporación, oxidación y biosíntesis de lípidos (**Seth et al., 2007**). Por otra parte, PPARGC1B es un miembro de la familia de los co-activadores de los receptores nucleares que modula la actividad transcripcional de genes vinculados con el metabolismo lipídico y es a su vez regulado negativamente por niveles crecientes de AGNEs circulantes (**Mortensen et al., 2007; Staiger, Stefan, Machicao, Fritsche, & Haring, 2006**).

Numerosas publicaciones señalan que los propios factores reguladores de la transcripción pueden ser sustratos de las calpaínas que modulan así su función. Durante la atrofia muscular inducida por sepsis las calpaínas regulan el recambio de CEBP, familia STAT, NF- $\kappa$ B y AP1 afectando así la expresión de genes involucrados en mantener la masa muscular (**Smith et al., 2008**). En modelos de injuria cerebral y neuro-degeneración las calpaínas modulan la actividad de factores de transcripción de la familia Sp (**Vosler, Brennan, & Chen, 2008**) y durante el proceso de consolidación de la memoria a largo plazo parecen modular la expresión de ciertos genes actuando sobre los miembros de la vía RAS/MEK/CREB (**Baudry & Bi, 2013**).

Uno de los principales genes bajo el control de PPAR $\delta$  es *Angptl4*. La proteína simil-angiopoyetina (ANGPTL4) codificada por este es una reconocida mioquina que modula la adipogénesis mediante la inhibición de la Lipoprotein Lipasa (LPL) del adipocito y estimula la lipólisis en el tejido graso (**Mandard et al., 2006**). En humanos, los niveles séricos aumentan significativamente en respuesta al ayuno prolongado, la restricción calórica crónica y el entrenamiento de resistencia (**Kersten et al., 2009**). La mayor disponibilidad de ácidos grasos no esterificados libres en la circulación (AGNEs) derivados de la lipólisis genera una importante retroalimentación positiva sobre *Ppard* y *Angptl4* en el músculo

esquelético, lo que a su vez provoca un aumento de la expresión de genes involucrado en la captación y  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Catoire et al., 2014; Robciuc et al., 2012).

Otro de los principales moduladores positivos de la oxidación de ácidos grasos en el músculo es la Adiponectina, una adipocina clásica que puede ser sintetizada y secretada también por las miofibras maduras y las células satélite (Delaigle, Senou, Guiot, Many, & Brichard, 2006; Fiaschi, Giannoni, Taddei, & Chiarugi, 2012). Su acción sobre el tejido diana provoca una sensibilización a los efectos de la insulina con incremento de la captación de glucosa y de ácidos grasos de cadena larga que posteriormente son oxidados (Tomas et al., 2002). La Adiponectina ejerce sus funciones biológicas mediante los receptores de membrana AdipoR1, AdipoR2 y T-Cadherina (Hug et al., 2004), siendo este último particularmente importante en músculo cardíaco y esquelético (Denzel et al., 2010; Ranscht & Dours-Zimmermann, 1991). En miotubulos derivados de biopsias de donantes humanos el nivel de ARNm de T-Cadherina fue reportado como 2-3 veces el de AdipoR1 y AdipoR2. El análisis de correlación con otros genes o proteínas reveló que *Ppard* es un determinante significativo de la expresión del gen de T-Cadherina (*Cdh13*), sugiriendo que las vías del PPAR $\delta$ -ANGPTL4 y de Adiponectina-T-Cadherina se encuentran estrechamente ligadas y que dicho receptor podría ser considerado como un nuevo gen diana de PPAR $\delta$  (Ordelleide et al., 2011).

Por otra parte, la incorporación al músculo esquelético de los ácidos grasos liberados durante la lipólisis requiere de una serie de proteínas entre las que se encuentra FABP4. Aunque tradicionalmente considerada como una molécula unidora de lípidos, recientemente se la ha señalado como una adipocina con múltiples funciones biológicas que incluyen la estimulación de la síntesis hepática de glucosa, de la secreción pancreática de insulina y de la proliferación de células musculares lisas (Furuhashi, Saitoh, Shimamoto, & Miura, 2014). En el caso del músculo esquelético y cardíaco parece ser expresada en el endotelio vascular capilar de estos órganos y está involucrada en el transporte trans-endotelial de los AGNEs (Iso et al., 2013). Al igual que *Angptl4*, *Adipoq* y *Cdh13*, el promotor del gen de FABP4 posee un elemento de respuesta a PPAR que es activado por agonistas de PPAR $\beta/\delta$  (Holst, Luquet, Kristiansen, & Grimaldi, 2003; Schachtrup, Emmeler, Bleck, Sandqvist, & Spener, 2004). Sorpresivamente, los adipocitos deficientes de FABP4 experimentan una lipólisis poco eficiente lo que demuestra un rol aún poco conocido para esta proteína (Coe, Simpson, & Bernlohr, 1999).

En el proceso de  $\beta$ -oxidación de AGNEs en el músculo esquelético intervienen coordinadamente numerosas enzimas citosólicas y mitocondriales. Uno de los pasos limitantes es la activación de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) que fueran liberados durante la lipólisis y posteriormente incorporados por el tejido diana. En el músculo esquelético, esta reacción es llevada a cabo por la enzima ACSL3 (long chain fatty acid-CoA ligase 3) que convierte los AGCL en ésteres de Coenzima A (AGCL-CoA) para que puedan ser ulteriormente utilizados en anabolismo o catabolismo de lípidos. Por otra parte, el gen que codifica para dicha proteína, *Acs13*, es regulado positivamente por PPAR $\delta$  mediante interacción directa con su promotor (A. Cao, Li, Zhou, Wu, & Liu, 2010).

En nuestro modelo experimental, los músculos esqueléticos derivados de individuos que recibieron BDA-410 por 3 semanas, sobre-expresaron el conjunto de genes directamente involucrados en los mecanismos específicos descritos anteriormente que responden a una actividad global pro-lipolítica y pro-oxidativa de los ácidos grasos libres. Nuestros resultados no nos permiten determinar con exactitud cuál sería el estímulo inicial que desencadena esta expresión génica diferencial a continuación de la inhibición del sistema de calpaínas. El mismo podría residir en determinadas proteínas del músculo que se reconocen como sustratos de dicho sistema proteolítico y que podrían regular el metabolismo energético, la secreción de mioquinas, etc. Por otro lado, la respuesta del músculo podría corresponder al efecto de moduladores secretados por otros tejidos como el adiposo, el hígado o el páncreas ya que la administración de BDA-410 es sistémica y podría estar afectando la homeostasis metabólica sistémica.

Un mecanismo “co-adyuvante” de la lipólisis en la reducción de la grasa corporal es la inhibición de la adipogénesis y de la diferenciación de los adipocitos hacia células maduras cargadas de lípidos. Hemos demostrado aquí que luego de la administración de BDA-410, el músculo esquelético de los ratones C57BL/6 gerontes sobre-expresa los genes de dos potenciales mioquinas con función anti-adipogénica, *Retnla* e *Ifi2712a*.

El gen *Retnla* codifica para una proteína rica en cisteínas denominada proteína simil-resistina que inhibe la diferenciación de los adipocitos (Blagoev et al., 2002) y sus niveles plasmáticos se correlacionan negativamente con el peso corporal, encontrándose disminuida su expresión en un modelo murino de obesidad (Moore et al., 2001). Actualmente es considerada como una nueva citoquina “ateroprotectora” ya que disminuye los niveles de colesterol circulante específicamente durante estados hiperlipidémicos (M. R. Lee et al.,

2014). Como señaláramos previamente, nuestros resultados indican que la inhibición del sistema de calpaínas en el músculo esquelético alteraría el perfil de expresión de genes reguladores del metabolismo lipídico creando un ambiente pro-lipolítico con aumento de AGNEs en la circulación general. Es razonable suponer entonces que el aumento de la expresión de *Retnla* observado en nuestro modelo podría ser reactiva a este fenómeno. *Ifi2712a* codifica para una adipocitoquina inducible por interferón (Interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A). Aunque pocos conocidos los detalles de su función, se ha reportado que una isoforma de la misma, ISG12b1, interactúa con el receptor nuclear NR4A1 y regula la expresión de UCP3, Ampk y PGC-1 en músculo esquelético de ratón. También parece existir para esta proteína una correlación negativa entre los niveles de su ARNm y el peso corporal, siendo prácticamente indetectable en ratones obesos ob/ob. Por otro lado, la sobre-expresión de ISG12b1 parece inhibir la diferenciación de los adipocitos y reducir el contenido de ADN mitocondrial (B. Li, Shin, & Lee, 2009). Al igual que fuera descrito para *Retnla*, luego de la inhibición del sistema de calpaínas se produjo la sobre-expresión de *Ifi2712a* en el músculo esquelético de los ratones gerontes, situación que podría contribuir entonces a la reducción de la grasa corporal previniendo la maduración/diferenciación de los adipocitos.

Analizados en su conjunto, nuestros resultados indican que la pérdida de peso y reducción del porcentaje de grasa corporal experimentado por los ratones gerontes tratados con BDA-410 no responden a variaciones en la ingesta calórica ni en la actividad locomotriz espontánea pero se acompañan en cambio, de un aumento significativo en la expresión de genes como *Angptl4*, *Adipoq*, *Ucp3*, *Dgat1* y *Ppard* en el músculo esquelético. Dado que este tejido representa aproximadamente el 25 % del peso corporal, resulta pertinente señalar aquí que moderados incrementos en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos pueden provocar cambios significativos en el gasto energético total (Fruebis et al., 2001). En sintonía con esto, el grupo dirigido por Sander Kersten reportó recientemente en ratones *Angptl4*<sup>-/-</sup>, una correlación inversa entre niveles circulantes de ANGPTL4, peso corporal y grasa corporal sin modificación en la ingesta calórica ni en la actividad locomotriz espontánea cuando comparados con animales Wild Type (Mattijssen et al., 2014). Por otra parte, ha sido señalado en numerosas publicaciones que la tradicional adipo-mioquina Adiponectina tiene un efecto metabólico sistémico provocando la pérdida de peso. Tanto en humanos como en

ratones C57BL/6 los niveles séricos de Adiponectina se correlacionan de manera inversa con el peso corporal (**Fruebis et al., 2001**).

Otro gen asociado a un fenotipo “delgado” es *Dgat1* que codifica para la Diacilglicerol O-aciltransferasa 1, una enzima del Retículo Endoplásmico involucrada en la síntesis de triglicéridos (TG) y retinol. Llamativamente, la sobre-expresión de esta enzima en el músculo esquelético es la responsable de la denominada “paradoja del atleta” donde ambos procesos, la oxidación de AGNEs y el depósito de TG aumentan en dicho tejido. Simultáneamente se encontraron sobre-expresados *Fabp4*, *Ucp3* y *Ucp1* (**Liu et al., 2009; Timmers et al., 2011**).

En nuestro análisis del transcriptoma tanto *Dgat1* como *Ucp3* se encontraron significativamente sobre-expresados, por lo que consideramos que un fenómeno similar podría estar teniendo lugar en el músculo esquelético de los ratones que recibieron BDA-410.

Uno de los principales efectos colaterales de los estados pro-lipolíticos e hiperlipidémicos es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en aquellos tejidos que experimentan una elevada tasa de utilización de AGNEs como fuente de energía, con el consiguiente incremento de la actividad mitocondrial y utilización de oxígeno como último aceptor de electrones. En el músculo esquelético cuya actividad metabólica se encuentra incrementada las principales especies que se producen son anión superóxido y óxido nítrico (NO). Las mismas pueden tener efectos deletéreos como así también modular numerosas funciones celulares (**Powers, Duarte, Kavazis, & Talbert, 2010**). Esta situación genera la puesta en marcha de mecanismos de respuesta al estrés oxidativo mediado en parte por enzimas que degradan las moléculas mencionadas como superóxido dismutasas (Sod), peroxiredoxinas (Prdx) y glutatión peroxidasas (Gpx).

Nuestros resultados señalan que en los músculos de los animales tratados con BDA-410 por 3 semanas, los genes de algunos miembros del sistema antioxidante como *Sod3*, *Prdx2*, *Gpx1*, *Gpx3* y *Nr2c2* se encontraron sobre-expresados. Hipotetizamos aquí que este fenómeno podría responder a una mayor producción de ROS causada principalmente por el mayor suministro y oxidación de ácidos grasos.

Otro elemento con un rol activo aunque no tradicional en la protección contra el estrés oxidativo en el musculo esquelético es la proteína desacoplante mitocondrial UCP3. Las UCP son una familia de proteínas mitocondriales (UCP1 a UCP3) que funcionan como

sitios de paso alternativo para los  $H^+$  desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial, desacoplando así este fenómeno a la producción de ATP mediada por la ATP sintetasa (**Divakaruni & Brand, 2011**). UCP3 es la forma predominante en músculo esquelético y su actividad parece estar activada principalmente por ácidos grasos libres y por ROS, cumpliendo funciones que van más allá del desacople descrito anteriormente. Así, UCP3 juega un importante rol estimulando, por un mecanismo desconocido, la  $\beta$ -oxidación como lo demuestra el estudio en animales UCP3<sup>-/-</sup>. Otra función de relevancia en el músculo esquelético es la protección contra las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo en situaciones de metabolismo energético incrementado. UCP3 atenúa la emisión de ROS por la cadena transportadora de electrones al interferir con el potencia de transmembrana (**Busiello, Savarese, & Lombardi, 2015**). En la última década, UCP3 ha sido sindicada también como una proteína reguladora del metabolismo energético al observar que una modesta sobre-expresión de la misma en el músculo esquelético recrea los efectos del ejercicio físico, incrementando el gasto energético y provocando una reducción en el peso corporal (**Aguer et al., 2013**). Resulta importante señalar aquí que la expresión de UCP3 es modulada positivamente por PPAR $\delta$  y sus agonistas (**Muoio et al., 2002**). Nuestro análisis del transcriptoma revela que en el músculo esquelético de los animales tratados con el inhibidor de calpaínas el gen que codifica para UCP3 se encontró significativamente sobre-expresado. Debemos recordar que dicho tejido mostró un marcado perfil de expresión génica compatible con la utilización predominante de ácidos grasos como fuente de energía.

En el capítulo I de la presente tesis demostramos que la administración de BDA-410 y consiguiente inhibición del sistema proteolítico de calpaínas se asocia a un aumento de los niveles del canal de calcio voltaje-dependiente del sarcolema denominado  $Ca_v1.1$  lo que se parecería ser responsable, al menos en parte, por la mejora en la fuerza de contracción observada en el músculo Sóleo de dichos individuos. También discutimos allí los diversos factores y mecanismos que pueden influir en la expresión de  $Ca_v1.1$ , entre los que se encuentra el factor de crecimiento insulino-símil, IGF-1 y sus proteínas de unión IGFBP.

Las funciones del IGF-1 sobre la fisiología sistémica en general y del músculo esquelético en particular son innumerables y su revisión escapa claramente a la presente tesis. Es necesario señalar aquí, sin embargo, que este factor trófico regula de manera positiva la masa muscular como así también el acoplamiento excito-contráctil y la inervación de las miofibras y su sobre-expresión tejido-específica previene el descenso de la fuerza



específica de contracción relacionada con el envejecimiento (**Gonzalez et al., 2003**). Respecto de uno de los posibles mecanismos explicatorios, nuestro grupo de trabajo ha publicado extensa evidencia que muestra cómo el IGF-1 regula positivamente la expresión de  $Ca_v\alpha_{1s}$  al inducir a miembros de la familia CREB a unirse al promotor del gen (**Zheng, Wang, & Delbono, 2002**). Luego de la intervención experimental con el inhibidor de calpaínas BDA-410, observamos una significativa sobre-expresión del gen que codifica para el IGF-1, para las proteínas de unión IGFBP isoformas 3 y 4 y para el factor de transcripción CREB3. Aunque es poco probable que el mecanismo anteriormente descrito sea el único teniendo lugar, hipotetizamos aquí que los niveles elevados de IGF-1 en el grupo de ratones gerontes tratados con BDA-410 podría contribuir al aumento en la expresión de  $Ca_v1.1$ .

Otro determinante principal de la fuerza de contracción es el manejo eficiente del calcio intracelular, desde su paso facilitado por la membrana plasmática, hasta las proteínas citosólicas que regulan su disponibilidad. Aquí el canal  $Ca_v1.1$  juega un rol fundamental permitiendo el ingreso de las primeras moléculas de dicho catión luego de la despolarización del sarcolema. Una vez en el citoplasma, el  $Ca^{+2}$  puede comportarse como un segundo mensajero para múltiples vías de señalización. Recientemente se ha reportado como la permeabilidad de  $Ca_v1.1$  al  $Ca^{+2}$  puede modular el metabolismo lipídico de la fibra muscular mediante un rol no tradicional (**Georgiou et al., 2015**). El mecanismo propuesto por Dimitra Georgiou y colaboradores comienza con la activación mediada por  $Ca^{+2}$  de CaMKII la cual fosforila y activa a la óxido nítrico sintasa (NOS) que mediante la producción de óxido nítrico (NO) redistribuye hacia el sarcolema al transportador de ácidos grasos libres (AGNEs), CD36. El consiguiente aumento en la incorporación de AGNEs estimula la vía de oxidación de los mismos que incluye enzimas como ACS, CPT-1, etc. Este fenómeno parecería auto-regularse mediante un *feedback* o retroalimentación positiva mediada por CaMKII sobre  $Ca_v1.1$  que al fosforilarlo potencia su actividad de canal de calcio. Sorpresivamente, en ratones transgénicos que poseen una mutación en el gen *Cacna1s* que impide el flujo de  $Ca^{+2}$  a través del canal pero no altera otras de sus funciones, la vía aquí descrita se encuentra notablemente disminuida y los animales muestran aumento del peso y grasa corporal, reducción de la capacidad de oxidar lípidos, tolerancia a la glucosa alterada, etc. sin cambios en la ingesta calórica o la actividad física espontánea (**Georgiou et al., 2015**). Creemos que este reporte en la literatura presenta claras evidencias de una interfaz “acoplamiento excito-contráctil – metabolismo energético” en el músculo esquelético

mediada en este caso por la actividad regulatoria de Cav1.1 sobre la oxidación de AGNEs y que puede a su vez tener un efecto beneficioso sobre la eficiencia de la generación de fuerza contráctil. Debemos recordar aquí que en nuestro modelo experimental, luego de la administración de BDA-410, se demostró la sobre-expresión a nivel proteico de Cav1.1 y a nivel génico de *Camk2d*, *Acs13*, *Ppard*, *Fabp4*, *Adipoq* y *Angptl4*, entre otros, cuyos productos están directamente involucrados en la generación, captación y oxidación de ácidos grasos no esterificados. Hipotetizamos entonces que un fenómeno similar al descrito por D. Georgiou podría estar teniendo lugar en los músculos de los ratones gerontes tratados con el inhibidor de calpaínas y que podría contribuir a la mejora observada en la fuerza específica de contracción.

En resumen, hemos demostrado en el presente capítulo que (1) la administración de BDA-410 provoca una reducción significativa del peso corporal, a expensas del contenido de grasa corporal y sin modificar la masa magra, la ingesta calórica o la actividad física espontánea; (2) la administración de BDA-410 y consiguiente inhibición del sistema de calpaínas en el músculo esquelético de ratones gerontes altera significativamente el perfil de expresión génica de dicho tejido por un mecanismo aún poco claro; (3) la sobre-expresión de los genes *Ppard*, *Angptl4*, *Adipoq*, *Cdh13*, *Acs13*, *Fabp4*, *Ifi2712A* y *Retnla* modula la interacción entre el músculo y el tejido adiposo generando un estado pro-lipolítico y anti-adipogénico, con aumento en la liberación, captación y oxidación de AGNEs que podría ser responsable entonces de la pérdida de peso y contenido graso corporal experimentada por estos individuos; (4) la inhibición del sistema de calpaínas se asocia a un aumento en los niveles de expresión del gen del IGF-1, fenómeno que podría contribuir al aumento de Cav1.1 en el músculo sarcopénico (tal como se describiera en el Cap. I).

## **II.D MATERIALES Y METODOS**

### **1) Ámbito del estudio.**

La serie de experimentos que componen el presente capítulo fue realizada por la tesista en el laboratorio del Dr. Osvaldo Delbono (Co-director de Tesis y Beca Doctoral), Departamento de Medicina Interna y Gerontología, Wake Forest University School of Medicine – Baptist Medical Center, Winston Salem, Carolina del Norte, EEUU. Las colaboraciones realizadas por otros investigadores/centros se señalan oportunamente.

### **2) Diseño metodológico.**

Descrito en Capítulo 1.

### **3) Características de los animales de experimentación. Criterios de selección.**

Descrito en Capítulo 1.

### **4) Inhibidor de Calpaínas BDA-410.**

Descrito en Capítulo 1.

### **5) Administración de BDA-410 in vivo. Protocolo de tratamiento.**

Descrito en Capítulo 1.

### **6) Ensayo in vitro de inhibición de calpaínas.**

Descrito en Capítulo 1.

### **7) Obtención y preparación de músculos esqueléticos.**

Los animales se eutanasiaron luego de completar el tratamiento con la solución vehículo o con BDA-410 durante 3 semanas. Excepto se indique lo contrario, la disección y obtención de los músculos se realizó de manera rápida y en condiciones libres de enzimas degradativas del ARN (ARNasas). A posteriori se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis. Para la extracción de ARN y el análisis del transcriptoma (microarray) se reservaron los músculos Gastrocnemios (o gemelos) y para los ensayos de proteómica e inmunoblots se utilizaron los músculos Soleo.

### **8) Determinación ex vivo de las dimensiones anatómicas del músculo esquelético.**

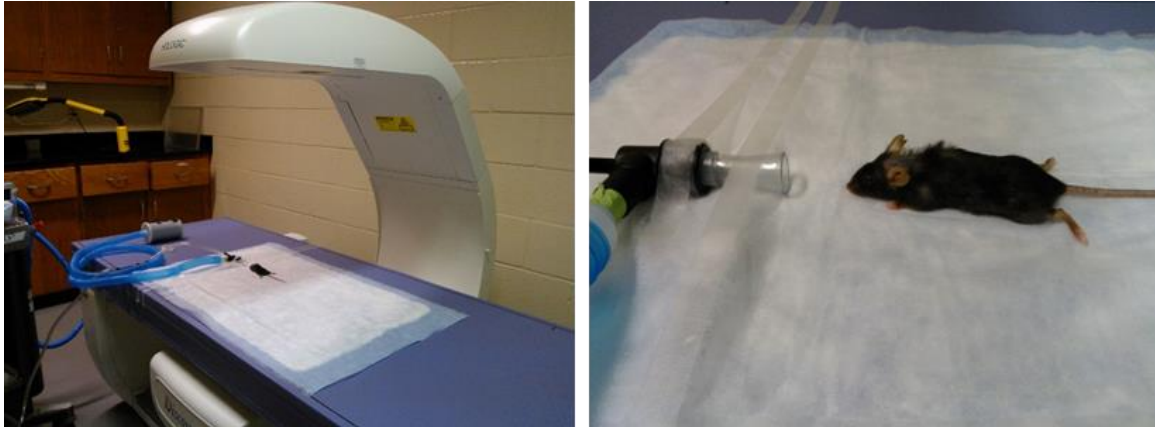
Luego de su disección y acondicionamiento, se determinaron las dimensiones anatómicas de cada músculo Soleo. Como aproximación al largo del músculo en su situación anatómica normal se midió la longitud de reposo  $L_0$  (definida como aquella a partir la cual el músculo desarrolla la máxima fuerza de contracción isométrica) inmediatamente después de efectuar

registros electrofisiológicos. A continuación, se eliminaron los tendones completamente, los músculos se secaron dos veces sobre papel de seda y se registró su peso. El área transversa se calculó dividiendo el peso en fresco del músculo por el producto entre la longitud estándar de la fibra muscular y  $1.06 \text{ g/cm}^3$ , que es la densidad universalmente aceptada del músculo esquelético de mamífero (S. V. Brooks & Faulkner, 1988). A su vez, la longitud estándar de la miofibra fue estimada multiplicando la longitud de reposo por 0.71, siendo esta última la relación aceptada entre la longitud de la fibra y  $L_0$  para el músculo Soleo (McCully & Faulkner, 1986; Warren, Hayes, Lowe, Williams, & Armstrong, 1994).

### 9) Determinación del peso y la composición corporal.

Todos los ratones se pesaron previo a comenzar la intervención experimental y luego de manera semanal durante la total duración del tratamiento. Para detectar cambios en el peso corporal se utilizó la siguiente fórmula:  $[(\text{peso corporal post intervención (gr)} - \text{peso corporal pre intervención (gr)}) / \text{peso corporal pre intervención (gr)}] * 100$ .

La composición corporal de cada individuo se determinó antes y después de la intervención terapéutica mediante densitometría de energía dual de rayos-X, comúnmente llamado DEXA (Hologic Discovery A dual energy X-ray densitometer, Hologic, Inc., Bedford, MA ubicado en Wake Forest Center for Comparative Medicine Research). Brevemente, el instrumento fue inicialmente calibrado usando un fantoma para pequeños roedores. Durante la adquisición de las imágenes (**figura II.D.1**) los animales se mantuvieron bajo anestesia inhalatoria (Isoflurano 2%) para evitar artefactos por movimiento. La información sobre la composición corporal fue obtenida utilizando el software adjunto al equipo de adquisición de imágenes (Discovery QDR System, Hologic, Inc.). Así, se obtuvieron datos de masa grasa, masa magra y densidad ósea. A continuación se procedió a calcular para cada individuo el porcentaje de cambio en el contenido graso corporal luego de la intervención experimental como  $[(\% \text{ grasa post intervención} - \% \text{ grasa pre intervención}) / \% \text{ grasa pre intervención}] * 100$ .



**Figura II.D.1. Determinación de la composición corporal mediante densitometría de energía dual de rayos-X.** Las imágenes muestran la adquisición de imágenes en un ratón C57BL/6 de 23 meses de edad mientras se encontraba bajo anestesia inhalatoria.

#### **10) Determinación de la ingesta de calórica e hídrica.**

Se determinó la ingesta diaria de alimento y agua para cada individuo antes y después de la intervención experimental como se detalla a continuación. Durante tres días consecutivos los ratones fueron alojados de manera individual en jaulas plásticas de piso sólido sin lecho alguno y mantenidos a 23°C con un fotoperiodo de 12 horas. Los animales tenían libre acceso a una ración de tamaño conocido de alimento balanceado en pellets (Prolab<sup>®</sup> RMH 3000, LabDiet, St. Louis, MO, USA) como así también a 100 mL de agua deonizada. Hacia el final del periodo de observación (72 horas) se colectó y se cuantificó el remanente de alimento balanceado (gr) y de agua de bebida (mL) en cada jaula. El polvo derivado de los pellets de alimento (“alimento derramado”) y resultante del comportamiento alimentario normal de estos roedores fue cuidadosamente colectado, separado de las heces y cuantificado.

Para cada individuo la ingesta diaria promedio de alimento fue calculada como  $[gramos\ consumidos\ de\ alimento\ al\ Día\ 0 - (gramos\ de\ alimento\ remanente\ al\ Día\ 3 + gramos\ de\ alimento\ derramado\ al\ Día\ 3)/3]$  y el consumo diario promedio de agua como  $(mililitros\ de\ agua\ en\ el\ bebedero\ al\ Día\ 0 - mililitros\ de\ agua\ remanente\ al\ Día\ 3)/3$ . Los valores así calculados fueron luego ajustados por el peso corporal en gramos de cada individuo.

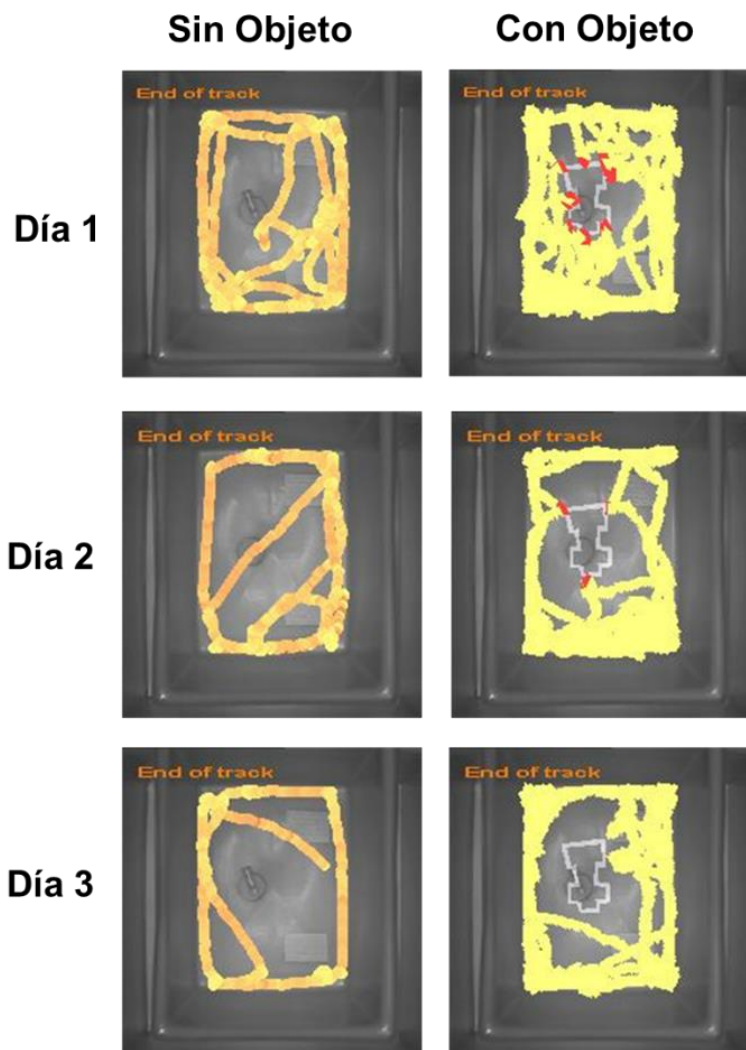
## 11) Registro de la actividad locomotriz espontánea.

*La presente metodología se desarrolló en el laboratorio del Dr. David Riddle (Department of Neurobiology and Anatomy, WFUSM, Winston Salem, NC, USA) bajo la supervisión e invaluable asistencia de Elizabeth Forbes.*

La actividad locomotriz espontánea de los ratones gerontes C57BL/6 fue registrada antes y después de la intervención experimental. Los movimientos del individuo reflejan un comportamiento orientado por un objetivo o meta como exploración, escape, búsqueda de alimento y están potencialmente afectados por los niveles de ansiedad. En todos los casos se registró al comienzo del periodo activo (6-7 pm) y utilizando un dispositivo de tipo “campo abierto” (open field), de 46 cm x 61 cm de área y 50 cm de alto e iluminado con un sistema LED (Light-Emitting Diode) infrarrojo lejano no visible (940 nm). La sala donde se desarrollaron las mediciones estaba acondicionada con luces verdes de baja intensidad ( $\leq 2$  lux) y presencia constante de ruido blanco. Estas condiciones reducen la ansiedad de los individuos y maximizan entonces la deambulación voluntaria (**Valentinuzzi et al., 2000**). La locomoción espontánea de cada individuo fue registrada por 2 minutos mediante una cámara CCTV sensible al espectro infrarrojo (Panasonic WV-BP334) que se encontraba a 152 cm de altura. Completado este periodo de evaluación se procedió a registrar otras dos sesiones de 5 minutos de actividad tanto en presencia como en ausencia de un objeto dentro del campo abierto y con el cual el animal podía interactuar (cruz de resina; 8cm x 10cm de área, 3cm de alto). Entre individuo e individuo se procedió a la limpieza y desinfección metódica de toda la superficie del campo abierto y al reemplazo del objeto utilizado por una réplica exacta del mismo. El registro (29 cuadros/seg) y análisis automatizado de la actividad locomotriz se realizó mediante el software

Ethovision XT 7.0 (Noldus Information Technology, Inc.) que utiliza un sistema de seguimiento del cuerpo del ratón basado en la identificación de tres puntos (hocico, centro del cuerpo y cola) (**figura II.D.2**). Así, se calcularon distancia total recorrida (cm recorridos por el punto de seguimiento ubicado en el centro del cuerpo del ratón), velocidad promedio (velocidad lineal promedio alcanzada por el punto de seguimiento ubicado en el centro del cuerpo), velocidad máxima (velocidad lineal-máxima) y el tiempo total en movimiento (porcentaje de la prueba que el individuo está en movimiento bajo parámetros definidos por velocidad de inicio  $\geq 13$  cm/seg y velocidad de parada  $\leq 5$  cm/seg). Todo este procedimiento

se repitió para cada individuo durante 3 días consecutivos tanto antes como después de la intervención experimental.



**Figura II.D.2. Evaluación de la actividad locomotriz espontánea en ratones C57BL/6.**

La figura muestra el patrón de movimiento generado por el sistema de seguimiento del ratón (líneas amarillas) dentro de la arena de experimentación, en ausencia (imágenes hacia la izquierda) o presencia (imágenes hacia la derecha) de un objeto inerte (trazo blanco en forma de cruz en el centro de la arena) durante 3 días consecutivos (Día1 a 3).

## **12) Procesamiento del microarray de ARN (transcriptoma), análisis estadístico y de minería de datos**

*La técnica del microarray se desarrolló en el Wake Forest Microarray Core, WFUSM, Winston Salem, NC, USA. El análisis posterior de los datos crudos allí obtenidos fue realizado en colaboración con el Dr. Martin C. Abba, CINIBA, FCM, UNLP, Argentina.*

El ARN total utilizado en el presente ensayo se aisló del músculo Gastrocnemio utilizando un protocolo basado en Trizol<sup>®</sup>. La calidad del producto extraído se analizó mediante Eukaryote Total RNA Nano assay (2,100 Expert). A continuación, se hibridizó con

Affymetrix mouse MG-430 GeneAtlas array strip (Affymetrix™, Santa Clara, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Para el análisis se utilizaron 4 replicados de cada grupo experimental (individuos tratados con vehículo, V<sub>1</sub> a V<sub>4</sub> e individuos tratados con el inhibidor de calpaínas, BDA-410<sub>1</sub> a BDA<sub>4</sub>). Sobre los datos crudos obtenidos se realizaron procedimientos de control de calidad (QC) y normalización en R/Bioconductor utilizando el paquete de datos simpleaffy (**Wilson & Miller, 2005**). Para ajuste de fondo o background, normalización cuantil y resumen de valores de sonda se utilizó el algoritmo RMA o Robust Multichip Average (**Irizarry et al., 2003**). Se utilizó t-test para comparar los perfiles de expresión de los grupos control y BDA-410. EL análisis estadístico y la visualización de los transcritos diferencialmente expresados mediante un mapa de calor se realizó con el MultiExperiment Viewer software (MeV 4.9) (**Saeed et al., 2003**). Los datos se consideraron significativos cuando  $p < 0.05$ . La anotación funcional automatizada y el análisis de enriquecimiento de genes se realizó mediante InnateDB online tool (**Breuer et al., 2013**). Dicho programa calcula la sobre-representación de vías biológicas específicas con respecto al total de genes ensayados y anotados. A continuación, se utilizó el recurso online REVIGO para resumir y visualizar los términos ontológicos (GO) enriquecidos en un mapa de dispersión basado en los valores de  $p$  obtenidos por Innate DB (**Supek, Bosnjak, Skunca, & Smuc, 2011**). Finalmente utilizamos STRING<sub>10</sub> (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins; <http://www.string-db.org/>) para identificar asociaciones funcionales entre genes seleccionados y generar un mapa o red de interacciones entre los productos de los mismos. Las asociaciones están basadas en algoritmos que usan información universalmente disponible respecto de co-expresión, co-ocurrencia, datos experimentales, bases de datos, minerías de textos, etc. (**Snel, Lehmann, Bork, & Huynen, 2000**).

*Los resultados completos del microarray aquí descrito serán depositados en la base de datos Gene Expression Omnibus al momento de su publicación.*

### **13) Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando Sigma Plot 12.5 (Systat Software, San José, CA) o Prism 6.0a (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). En todos los casos los resultados se presentan como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). El nivel de alfa se estipuló a  $p < 0.05$ . Para comparar grupos experimentales se utilizó Student  $t$ -test o Análisis de la Varianza (ANOVA) según correspondiera.



## **CAPITULO III.**

### **Transferencia Génica Al Músculo Esquelético Postnatal Mediante Magneto-Adenovectores.**

*Prueba De Concepto De Una Metodología Emergente.*

Los resultados experimentales que se muestran en el presente capítulo forman parte de un proyecto de investigación que diseñamos y ejecutamos como complemento del plan de tesis que se presentara oportunamente.

El objetivo de dicho proyecto es desarrollar una metodología de transferencia génica aplicable al músculo esquelético post-natal que nos permita manipular de manera eficaz, ágil y segura los niveles de expresión de ciertas proteínas de interés durante el desarrollo de la sarcopenia.

La ejecución se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner”, en estrecha colaboración teórica y práctica con expertos nacionales e internacionales como los Dres. Francisco H. Sánchez (Instituto de Física La Plata, FCE, CONICET-UNLP, La Plata, BA, Argentina) y Olga Mykhaylyk (Institute of Immunology and Experimental Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Munich, Alemania).

### III.A INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS

Se han realizado importantes avances en el desarrollo de tecnologías de transferencia génica nos que permiten contar actualmente con vectores más seguros, con mayor permanencia en los sistemas biológicos, con especificidad celular y expresión regulable. La asociación de vectores virales con la nanotecnología ofrece ahora la posibilidad de desarrollar estrategias más eficaces de la transferencia génica para un gran número de aplicaciones in vitro e in vivo (**Plank, Zelphati, & Mykhaylyk, 2011**). En 1978, K.J. Widder introdujo el concepto de Direccionamiento de Drogas Magnéticas (Magnetic Drug Targeting) y describió cómo los complejos terapéuticos con capacidad magnética podían concentrarse en áreas del cuerpo por medio de campos magnéticos externos (**Widder, Senyel, & Scarpelli, 1978**). A comienzos del siglo XXI este principio fue aplicado a la transferencia de ácidos nucleicos, surgiendo así una metodología de transfección asistida por un campo magnético denominada magnetofección (**Scherer et al., 2002**).

La magnetofección está basada en la asociación de nanopartículas magnéticas (NPMs) con vectores virales y no virales para optimizar la transferencia de ADN o ARN en presencia de un campo magnético. Los “vectores magnéticos” resultantes deben ser suficientemente biocompatibles para las aplicaciones en las células y organismos y su respuesta magnética debe ser suficiente para permitir la concentración en el área diana bajo la influencia de una fuerza magnética (**Plank et al., 2011**). La disponibilidad actual de NPMs no tóxicas, versátiles y estables ofrece la posibilidad de implementarlas para diversos propósitos biomédicos como la terapia neoplásica a través de hipertermia controlada, clasificación y separación celular, administración de fármacos, terapia génica y celular, y Resonancia Magnética (**Gupta & Gupta, 2005**). Los protocolos detallados para la síntesis de NPMs y su caracterización biofísica han sido ya ampliamente descritos en la literatura (**Mykhaylyk et al., 2009; Tresilwised et al., 2012; Zhao et al., 2014**) así como también el mecanismo de captación y metabolismo celular (**Oh & Park, 2014**).

Una de las características más importantes de la transfección basada en NPMs es la capacidad para ingresar en, virtualmente, cualquier tipo de célula debido a su captación endocítica independiende de receptor. Esto es especialmente útil en células tradicionalmente difíciles de transducir y transfectar como los fibroblastos NIH-3T3 (**Sapet, Pellegrino,**

**Laurent, Sicard, & Zelphati, 2012)**, las células de melanoma y cancer de mama (**Choi et al., 2015**), linfocitos sanguíneos periféricos humanos (**Scherer et al., 2002**) y células maduras del músculo esquelético o miofibras (**Lemieux et al., 2000**).

Los progenitores del músculo esquelético, denominados mioblastos, son células mononucleadas y mitóticamente activas, las cuales se dividen rápidamente hasta que señales externas las obligan a salir del ciclo celular y a fusionarse en miofibras multinucleadas y elongadas (llamados miotúbulos *in vitro*). Es bien conocido que el músculo esquelético sufre, durante el proceso de maduración, una pérdida de susceptibilidad a la infección por Adenovirus salvajes y vectores Adenovirales recombinantes (**Acsadi et al., 1994; Huard et al., 1995**) lo cual puede representar una limitación principal en el uso de estos para la transferencia y la terapia génica. Se cree que cambios bioquímicos y estructurales en el músculo esquelético son los responsables de este fenómeno. La entrada a las células del Adenovirus salvaje y su contraparte recombinante (Ad y RAd respectivamente) comprende una secuencia de dos pasos que involucra a diferentes proteínas de membrana: un receptor primario de gran afinidad, el Receptor de Coxsackievirus y Adenovirus (CAR), que intercede en la adhesión del virus a la superficie celular, y receptores secundarios de baja afinidad (integrinas  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta5$ ) que permiten la internalización de las partículas virales (**Tomko, Xu, & Philipson, 1997; Wickham, Mathias, Cheresch, & Nemerow, 1993**).

Diversos estudios han demostrado que, durante el desarrollo del músculo esquelético de ratas, ratones y humanos, la expresión de receptor primario CAR disminuye severamente aun en edades tempranas, siendo el ARNm apenas detectable en las miofibras de los individuos adultos (**Nalbantoglu, Pari, Karpati, & Holland, 1999**). Por otra parte, la lamina basal y el glicocáliz que rodean las células del músculo esquelético maduro parecen ser una barrera anatómica que puede limitar el acceso de la partícula viral (**B. Cao et al., 2001**). Por último se ha demostrado que la expresión forzada de CAR en los miotúbulos permite aumentar significativamente el nivel de transducción mediada por Ad/RAd de estas células (**Kimura et al., 2001; Nalbantoglu et al., 2001**).

Para comprender la fisiología y fisiopatología del músculo esquelético, a veces es necesario manipular los niveles de expresión génica de dicho tejido o bien introducir información génica con capacidad terapéutica. El músculo esquelético adulto puede ser transfectado *in vivo*, con baja eficacia, mediante inyección directa de plásmidos desnudos

(Wolff et al., 1990), lípidos cationidos, polímeros neutrales (X. Gao & Huang, 1995; Lemieux et al., 2000), o mediante electroporación (Marco Sandri, Bortoloso, Nori, & Volpe, 2003). Sin embargo, ninguna de estas técnicas posee el potencial demostrado por los vectores virales, los cuales son herramientas de transfección altamente eficaces a nivel de los mioblasto (Sapru, McCormick, & Thimmapaya, 2002; Y. Wang et al., 2000).

Así, elaboramos como objetivo general desarrollar una metodología que permita aumentar el nivel de transducibilidad mediada por adenovectores del músculo esquelético maduro. Específicamente propusimos (1) determinar la eficacia de transducción de los complejos formados por adenovectores virales recombinantes y nanopartículas magnéticas (RAd-NPMs) en un modelo in vitro de músculo esquelético maduro bajo la guía de un campo magnético externo; (2) determinar si dicha eficacia resulta superior o inferior a la alcanzada por los adenovectores virales desnudos; (3) determinar las condiciones experimentales óptimas para transducir in vivo y mediante la técnica de la magnetofección el músculo esquelético de ratones C57BL/6 adultos.

## III.B RESULTADOS

### *III.B.1. Preparación y caracterización de nanopartículas magnéticas y magneto-adenovectores*

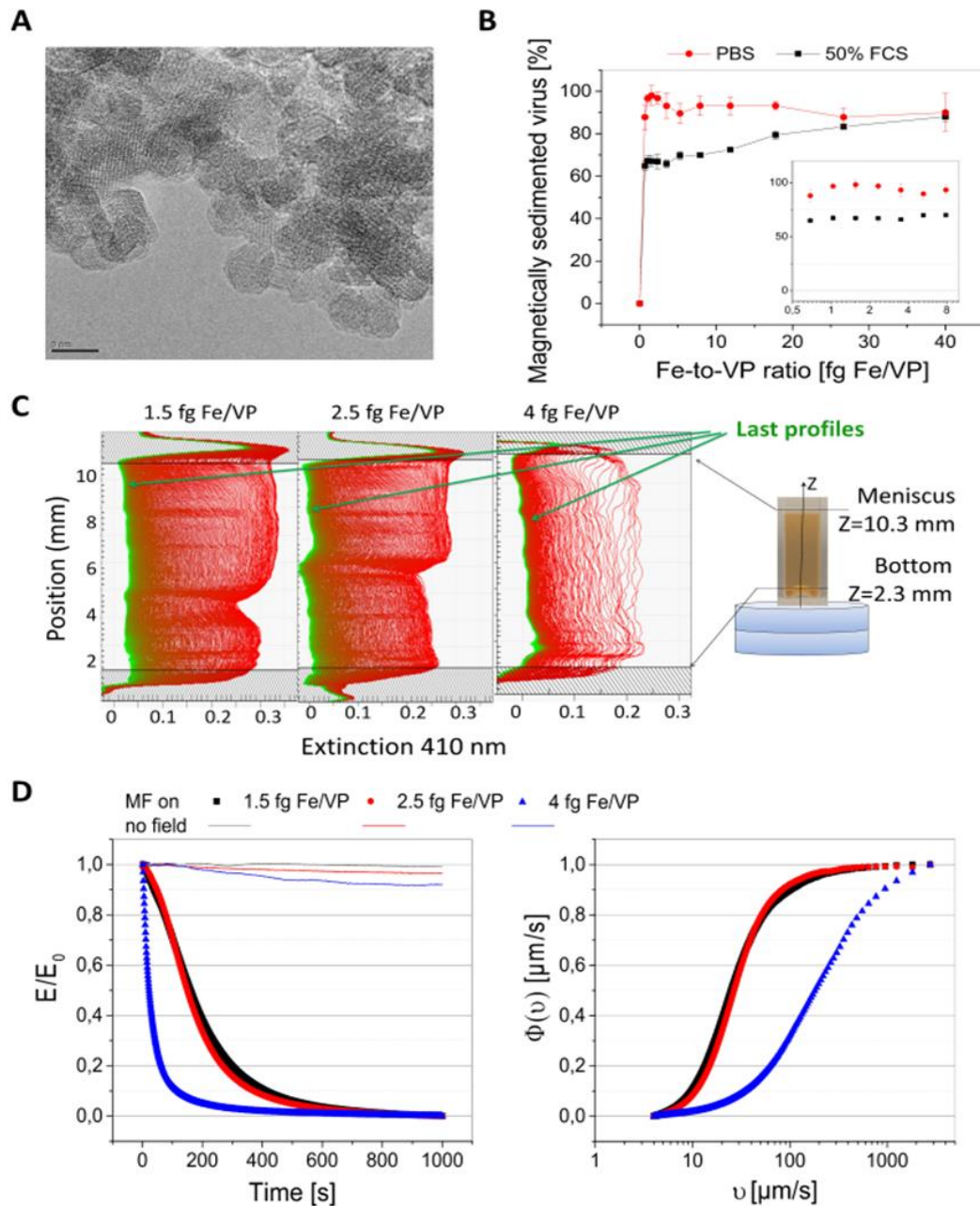
Las propiedades fisicoquímicas de los MNPs utilizadas para formular complejos adenovirales magnéticos han sido extensamente descritas en publicaciones previas de nuestro grupo colaborador (**Plank et al., 2011; Tresilwised et al., 2012**). PEIMag2 son nanopartículas (NPs) con un núcleo de óxido de hierro o magnetita de un tamaño promedio de 9 nm, magnetización de saturación de 62 emu/g Fe y una cubierta superficial que consiste en un surfactante fluorinado ZONYL FSA (litio 3-[2-(perfluoroalkyl)etil]tio] propionato) combinado con polietilenimina ramificada de 25 kDa de tamaño molecular. Esto resulta en un potencial zeta de  $+55.4 \pm 1.6$  mV en agua. Las partículas conjugadas con Atto550 (Atto-550-PEIMag2) contienen en promedio 15 moléculas del conjugado fluorescente por nanopartícula magnética insulada proporcionándole así fluorescencia roja. La carga con las moléculas mencionadas permite asegurar una fluorescencia brillante de las partícula/complejos en la célula y mantener la carga positiva de superficie lo suficientemente alta como para estabilizar las partículas y permitir la asociación con las partículas adenovirales cargadas negativamente.

Como se muestra en la Figura 1B, la cantidad de adenovirus que se asoció y sedimentó magnéticamente con PEIMag2 en PBS fue mayor a medida que se incrementaba la relación Nanopartículas magnéticas-por-Partícula Viral (NPM-por-PV) y fue equivalente a más de 90% de las partículas virales iniciales cuando NPM-por-PV era mayor a 1 fgFe/PV. Cuando los complejos así formados se incubaron en presencia de 50% SFB durante 30 minutos, ocurrió la desestabilización parcial de los complejos adenovirus-NPM; sin embargo, hasta el 60% de las partículas adenovirales pudieron ser magnéticamente sedimentadas debido a su unión con PEIMag2. Basados en estos resultados como así también en la información previa disponible sobre optimización de los magneto-adenovectores (**Tresilwised et al., 2012**), los complejos para la transducción *in vitro* fueron ensamblados utilizando relaciones NPM-por-PV de 1,5 y 2,5 fgFe/PV y para los ensayos *in vivo* se seleccionó una relación de 4 fgFe/PV. Todos los magneto-adenovectores mostraron un potencial electroquinético positivo con un diámetro hidrodinámico promedio de 601, 521 y 937 nm, respectivamente (**Tabla III.B.1**).

Los datos sobre el aclaramiento de los complejos en suspensión cuando estuvieron sujetos a un gradiente de campo definido (mostrado en términos de la extinción relativa  $E/E_0$  a 410 nm graficado vs. tiempo, **Figura III.B.1D, izquierda**) se graficaron contra la velocidad magnetoforética  $v$  (**Figura III.B.1D, derecha**) para generar una función de distribución de velocidad acumulativa  $\Phi(v)$ . Como los complejos no mostraron una sedimentación detectable bajo la acción aislada de la gravedad, la  $\Phi(v)$  describe al radio de la partícula como teniendo una velocidad magnetoforética  $v_i$  menor o igual al valor  $v_i$ . Los valores magnetoforéticos medios  $v_{0.5}$  para los tres complejos adenovirus-NPMs y los correspondientes valores medios del momento magnético  $M$  del complejo y el número de nanopartículas magnéticas  $N$  por complejo/conjunto de complejos están dados en la **Tabla 1**. Los resultados sugieren que hay múltiples nanopartículas que rodean a una partícula viral.

<i>Complejo</i>	<i>NPMs-a-PV (fg Fe/PV)</i>	$\xi$ (mV)	$D_h$ (nm)	$t_{0.5}$ (s)	$v_{0.5}$ ( $\mu\text{m/s}$ )	$M$ ( $10^{-15} \text{Am}^2$ )	$N=M/m_{eff}$
RAAd-PEI-Mag2	1.5	$+11.4 \pm 1.1$	601	154	26	3.9	$4.8\text{E}+04$
RAAd-PEI-Mag2	2.5	$+10.2 \pm 0.5$	521	168	24	3.1	$3.8\text{E}+04$
RAAd-Atto550-PEI-Mag2	4	$+12.1 \pm 0.2$	937	22	184	43.2	$5.2\text{E}+05$

**Tabla III.B.1. Características de los magneto-adenovectores ensamblados a distintas relaciones NPMs-a-PV.**  $\xi$ : potencial electroquinético;  $D_h$ : diámetro hidrodinámico medio medido a una densidad de flujo magnético y gradiente de campo de 0.16 T y 33.5 T/m, respectivamente;  $t_{0.5}$ : tiempo para la separación magnética del 50% de los complejos;  $v_{0.5}$ : valores medios de la movilidad magnetoforética;  $M$ : momento magnético;  $N$ : número de nanopartículas por complejo;  $m_{eff}$ : es un momento magnético efectivo del núcleo de las nanopartículas que corresponde a un diámetro medio del núcleo de magnetita de 9 nm y a una saturación de magnetización de 62 emu/g de hierro.



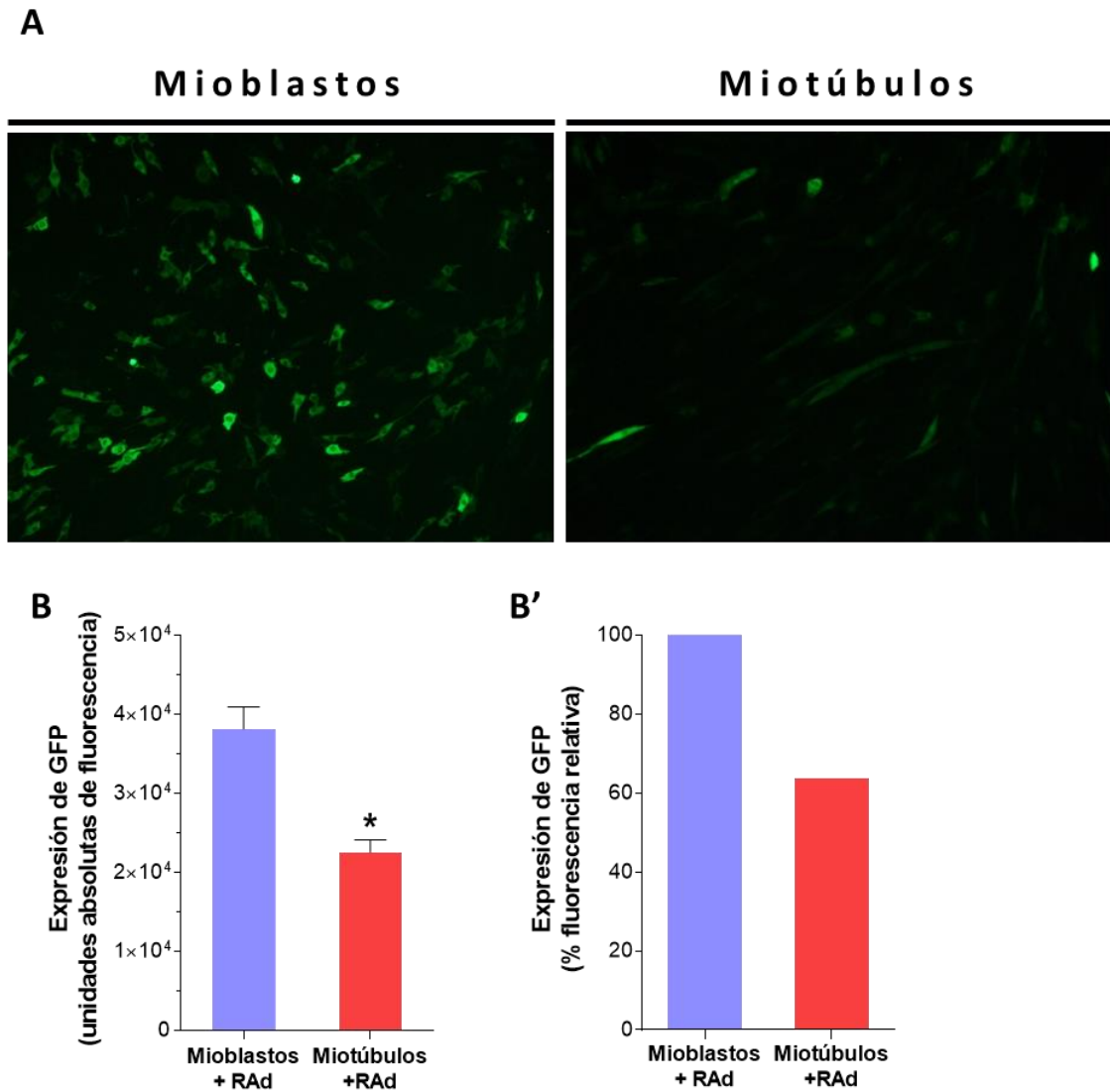
**Figura III.B.1. Caracterización física de las Nanopartículas Magnéticas y de los Magneto-adenovectores.** (A) Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión de las NPMs PEI-Mag2; barra=5 nm. (B) Porcentaje de los magneto-adenovectores sedimentados magnéticamente vs. La relación NPM-a-PV (fgFe/PV). (C) y (D) Movilidad magnetoforética de los magneto-adenovectores caracterizada por la cinética de aclaramiento de la suspensión durante la aplicación de un gradiente de campo magnético. En (C) se muestran los perfiles de extinción a 410 nm. El esquema de la derecha muestra la disposición de la cubeta y de los imanes. En (D) se graficó la extinción a 410 nm normalizada,  $E/E_0$ , promediada a lo largo de la altura de la cubeta versus el tiempo de exposición al campo magnético (MF on) o sin exposición al mismo (no field). El gráfico de la derecha muestra la función de distribución de velocidad acumulativa  $\Phi(v)$ .



### ***III.B.2. La transferencia génica con vectores adenovirales desnudos posee baja eficacia en miotúbulos maduros de la línea celular C2C12.***

Para determinar la eficacia de la transducción mediada por vectores Adenovirales Recombinantes (RAd) en mioblastos y miotúbulos maduros de la línea celular C2C12 los mismos se incubaron con RAd-GFP a una relación de 60 partículas virales infecciosas por célula (MOI 60) y 48 horas después se tomaron imágenes con microscopia de fluorescencia. El número de miotúbulos GFP-positivos (**Figura III.B.2, panel A<sub>2</sub>**), así como la intensidad de su fluorescencia, fue menor comparado con los resultados obtenidos de mioblastos transducidos con la misma metodología (**Figura III.B.2, panel A<sub>1</sub>**). A continuación se cuantificaron los niveles de GFP en lisados celulares y los resultados se expresaron en Unidades de Fluorescencia absoluta y relativa (**Figura III.B.2B y B'**).

Como se esperaba, los valores fueron significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) en los miotúbulos cuando comparados con mioblastos a la misma tasa de infección o MOI ( $22487.7 \pm 1599.2$  y  $38139.2 \pm 2790.9$  unidades de fluorescencia, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de nuevas estrategias para mejorar la transferencia génica mediada por vectores adenovirales en el músculo esquelético maduro.

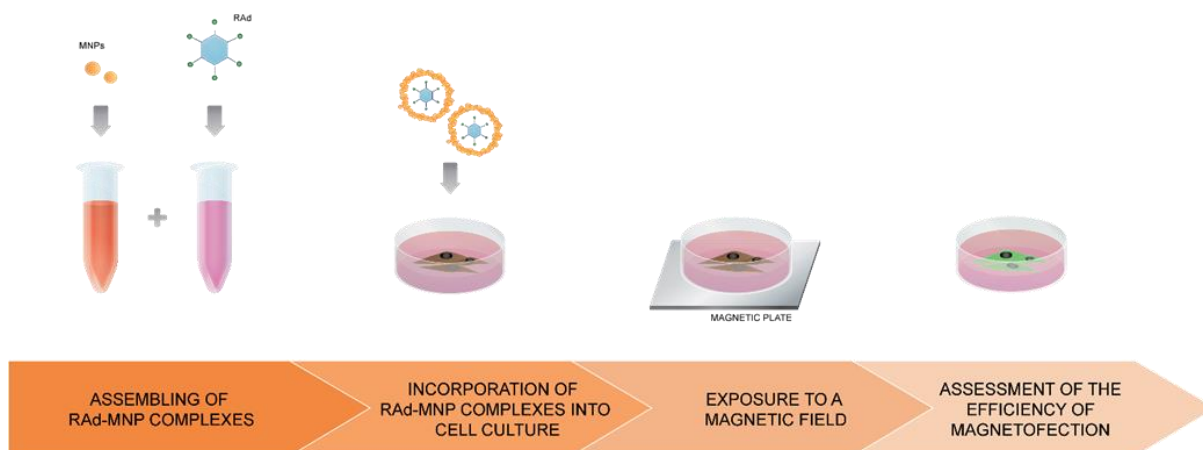


**Figura III.B.2. Transferencia génica convencional con vectores adenovirales desnudos alcanza baja eficiencia en miotúbulos maduros.** Mioblastos y miotúbulos maduros de la línea celular C2C12 se incubaron durante 60 minutos con un vector adenoviral recombinante, RAD-GFP, a una MOI de 60 partículas virales por célula. Para determinar el nivel de expresión de GFP alcanzado 48 horas después de la transducción, se procedió a la visualización directa de las células y la posterior cuantificación de la fluorescencia. **(A)** Imágenes de microscopía representativas de mioblastos (izquierda) y miotúbulos (derecha) transducidos con RAD-GFP. Luego de la adquisición de imágenes se llevó a cabo el lisado celular y la cuantificación de la proteína fluorescente. La comparación entre ambos grupos fue graficada como valores absolutos **(B)** y relativos a la fluorescencia de los mioblastos **(B')**. La fluorescencia inespecífica proveniente de las células solas y del buffer de lisis se restó a cada grupo antes del análisis de los datos. \* Significancia estadística con  $p < 0.05$  entre los grupos experimentales. Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M.  $n=3$  para cada grupo. Magnificación, 10X.

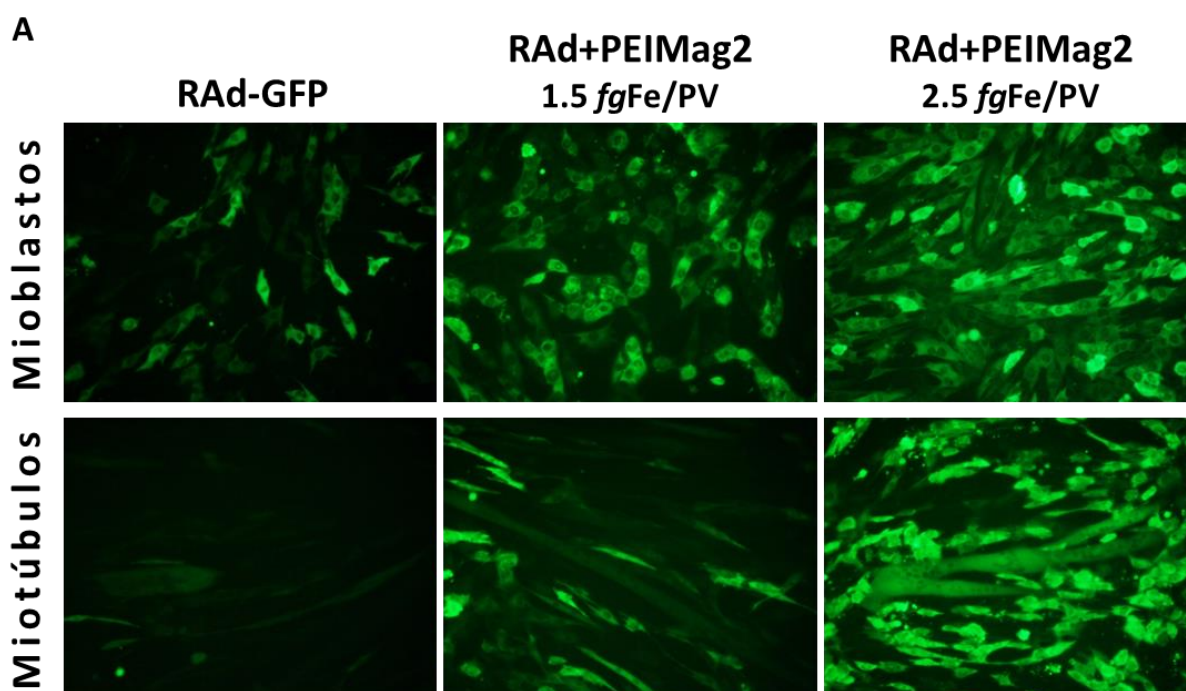
### ***III.B.3. La magnetofección mejora la transferencia génica mediada por adenovectores virales en mioblastos y miotubulos de la línea C2C12***

Se comparó la eficacia del protocolo de transducción convencional basado en el empleo de RAd, respecto a la magnetofección. Los mioblastos y miotúbulos se incubaron con RAd-GFP o con complejos RAd-GFP+NPMs, como se describió previamente (**Figura III.B.3**). Se eligieron las nanopartículas PEIMag2 y se estudiaron dos relaciones diferentes de fgFe por partícula viral (fgFe/PV). Todos los cultivos fueron expuestos al campo magnético durante 30 minutos y se realizó una incubación adicional sin imán durante otro período de igual duración luego del cual se retiraron las mezclas de transfección o magnetofección. A las 48 horas se obtuvieron imágenes de los mioblastos (**Figura III.B.4, panel superior**) y los miotúbulos (**Figura III.B.4, panel inferior**), y subsecuentemente se cuantificó la señal de fluorescencia. El empleo de complejos RAd-NPMs combinado con un campo magnético, generó un nivel de transducción significativamente mayor, cuando se lo compara con el protocolo convencional de RAd desnudo ( $p < 0.05$  para ambos grupos experimentales). En el caso de los mioblastos magnetofectados, los niveles de GFP fueron 5.9 y 12.8 veces mayor con el uso de 1.5 y 2.5 fgFe/VP, respectivamente (**Figura III.4.B y B'**). En el caso de los miotúbulos maduros, la incubación con complejos RAd-GFP+PEIMag2 provocó un incremento de la intensidad de fluorescencia de 7.1 (para 1.5 fgFe/VP) y 23.6 veces (en 2.5 fgFe/VP) (**Figura III.B.4C y C'**).

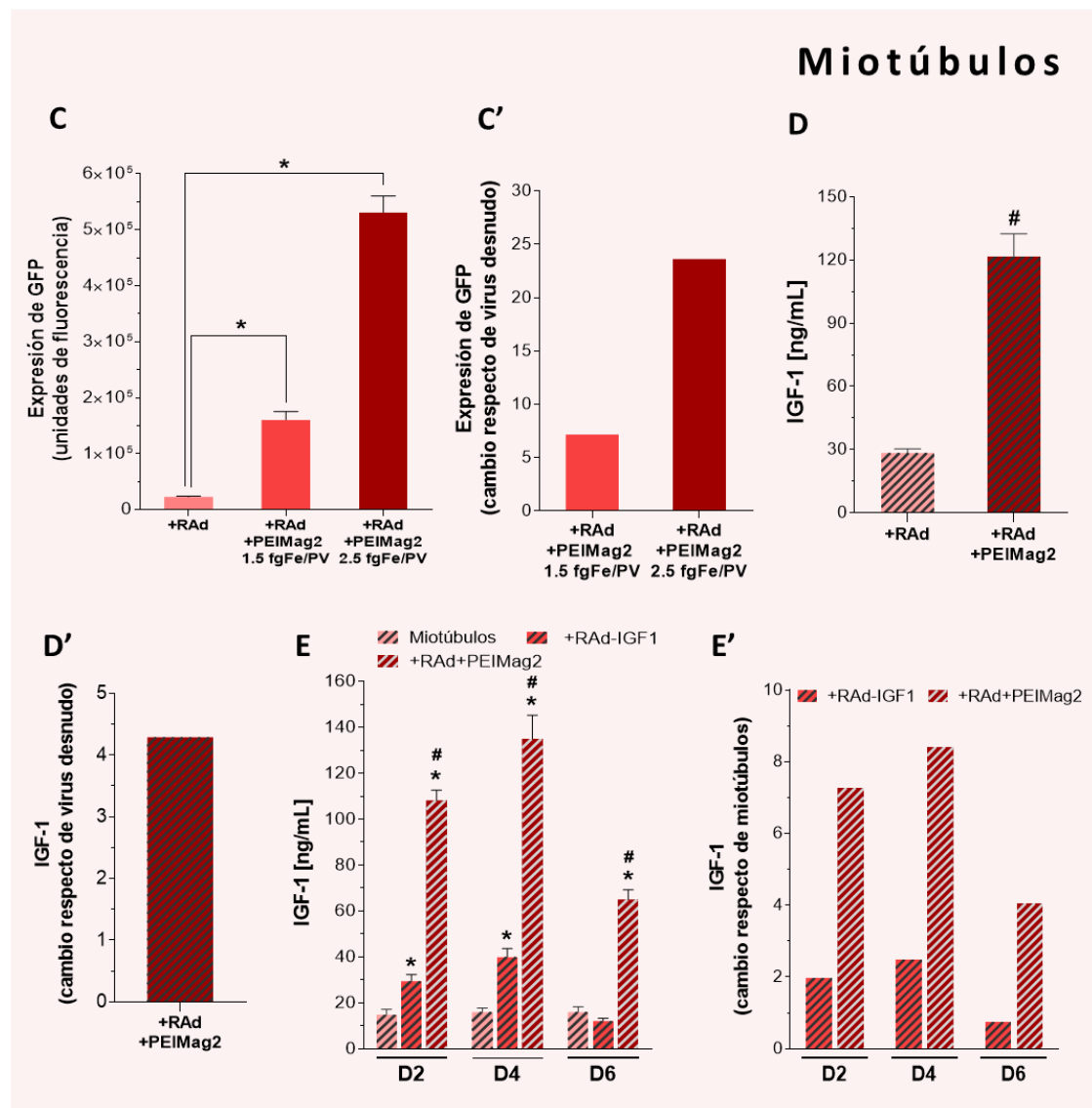
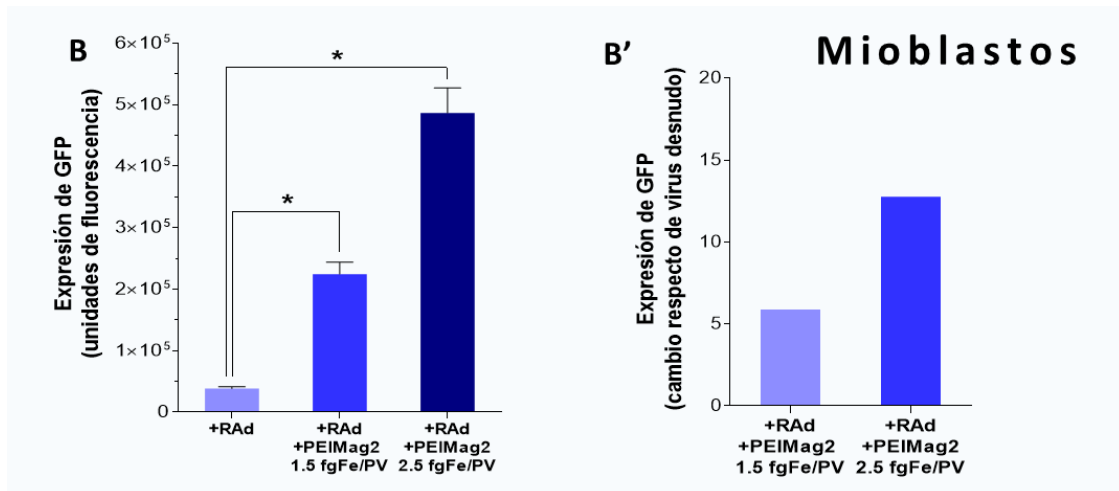
Dado que el músculo esquelético es frecuentemente utilizado como un sitio de producción ectópica para varias moléculas de secreción con funciones parácrinas y endócrinas, decidimos evaluar si la magnetofección podría mejorar la producción y secreción de IGF-1 por células en cultivo. Los miotúbulos de la línea C2C12 se incubaron con RAd-IGF-1 desnudo o con complejos RAd-IGF-1+PEIMag2 tal como fuera descrito anteriormente para RAd-GFP. Los niveles de IGF-1 secretados al medio extracelular se midieron por RIA 48 horas después. En los miotúbulos magnetofectados se registró un aumento de 4.3 veces ( $p < 0.001$ ) en los niveles de IGF-1, en comparación con las células transducidas con virus desnudo (**Figura III.B.4D y D'**).



**Figura III.B.3. Magnetofección en cultivos celulares.** La presente ilustración muestra el protocolo general de trabajo para la aplicación de magnetofección *in vitro*. Los complejos RAd-NPMs se pre-ensamblan en el tubo de ensayo y luego se introducen a las células gota a gota sobre el medio de cultivo que las cubre. A continuación las células son expuestas a un campo magnético que genera un gradiente de campo perpendicular a la superficie donde crece la monocapa. La eficiencia del proceso se evalúa por diferentes métodos 48 horas después.



**Figura III.B.4. La magnetofección potencia la transferencia génica mediada por vectores adenovirales en mioblastos y miotubulos.** *Ver descripción de la leyenda luego de los gráficos de barras.*



**Figura III.B.4. La magnetofección potencia la transferencia génica mediada por vectores adenovirales en mioblastos y miotubulos.** (A) Imagen de microscopia de fluorescencia representativa de mioblastos (paneles superiores) y miotubulos (paneles inferiores) infectados con RAd-GFP o RAd-GFP+NPMs a radios de NPMs-a-Partícula Viral de 1.5 y 2.5 fgFe/VP. Luego de obtener las imágenes, las células se lisaron y se cuantificaron los niveles de GFP en el homogenato resultante. La comparación entre la transducción viral convencional y la magnetofección se graficó como niveles de fluorescencia absolutos (**B** y **C**) y relativos (**B'** y **C'**). La fluorescencia inespecífica proveniente de las células, las NPMs y el buffer de lisis fue sustraída de cada grupo previo al análisis de los datos.

Para determinar la eficiencia de la magnetofección en el caso de RAd-IGF-1, a las 48 horas de la infección se colectó sobrenadante y se midieron los niveles de IGF-1. La comparación entre la transducción viral convencional y la magnetofección se graficó como niveles absolutos (**D**) y relativos (**D'**). Los niveles basales de IGF-1 detectados en cultivos no infectados fueron sustraídos en ambos grupos experimentales a fin de obtener los valores derivados solo de la producción mediada por la infección viral. En un subgrupo de miotubulos, la expresión de IGF-1 se analizó a los días 2 (**D2**), 4 (**D4**) y 6 (**D6**) después de la transferencia génica con vectores desnudos o con magnetoadenovectores. En (**E**) se muestran los valores absolutos de IGF-1 y en (**E'**) los relativos a miotubulos no infectados.

\*p < 0.05 entre miotubulos no infectados e infectados con virus desnudo o magnetoadenovectores.

#p < 0.05 entre miotubulos infectados con virus desnudo y con magnetoadenovectores

Los datos se representan como la media ± E.E.M. n=3 para GFP, n=4 for IGF-1 a las 48 hs y n=6 para IGF-1 en el análisis longitudinal; fgFe/PV = femtogramos de hierro por Partícula Viral.

#### ***III.B.4. La transferencia génica mediada por magnetofección genera mayores niveles de IGF-1 secretado y por un tiempo más sostenido que cuando se utilizan vectores adenovirales desnudos***

En un subgrupo de miotúbulos de la línea C2C12 incubados con RAd-IGF-1 o con complejos RAd-IGF-1+NPMs, se realizó un análisis temporal breve de la expresión del mencionado factor de crecimiento. La eficacia de transducción se determinó midiendo los niveles de IGF-1 en el medio de cultivo celular a los 2, 4 y 6 días después de la transferencia génica.

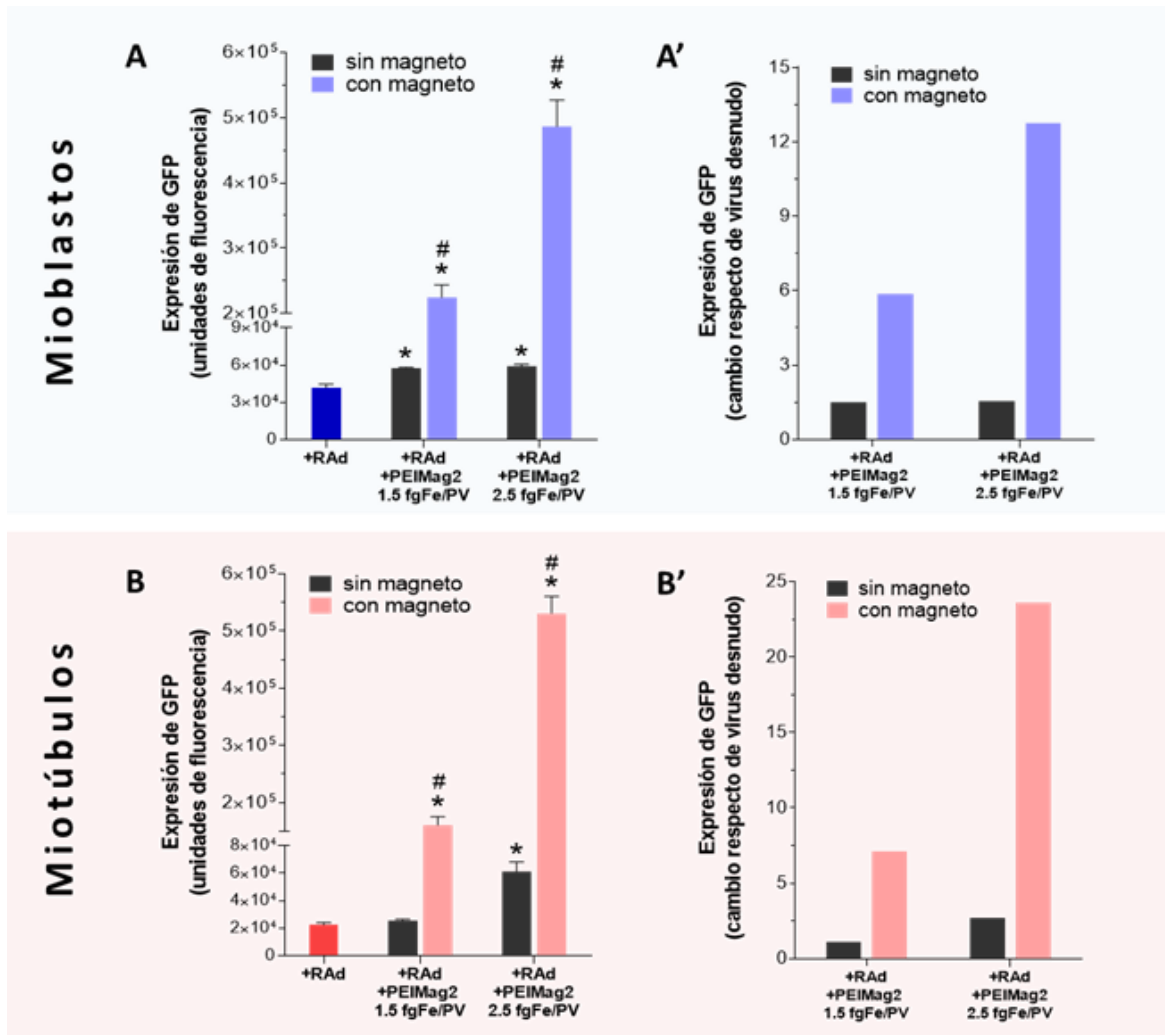
Como se muestra en la **Figura III.B.4E y E'**, se observó para ambos grupos experimentales una significativa sobreexpresión inicial de IGF-1 en comparación con los niveles registrados para los miotúbulos control no infectados (1.98 a 7.27 veces para RAd-IGF-1 y RAd+PEIMag2 respectivamente; \*p< 0.05). Sin embargo, la magnetofección fue 3.3 a 5.9 veces más eficaz (#p< 0.05) que la transducción convencional mediada por RAd desnudo en cada punto en el tiempo analizado aquí. Al día 6, el IGF-1 secretado por los miotúbulos transducidos retornó a los valores basales, mientras que la concentración

determinada para el grupo magnetofectado se mantuvo significativamente elevada ( $\#p < 0.05$ ).

### ***III.B.5. El campo magnético es un componente fundamental de la magnetofección.***

Varios reportes bibliográficos sugieren que las NPMs podrían influir en la transferencia de genes incluso en ausencia de un campo magnético (ver discusión para más detalles). Con el fin de comparar la eficacia de magnetofección con y sin imán se realizó el siguiente experimento. Se incubaron mioblastos (**Figura III.B.5A y A'**) y miotúbulos de la línea C2C12 (**Figura III.B.5B y B'**) con complejos RAd-GFP+NPMs tal como se describió anteriormente, y luego se colocaron sobre una placa magnética durante 30 minutos, a excepción del grupo sin imán. Un subconjunto de células se incubó sólo con RAd-GFP desnudo y se utilizó como grupo de referencia para la comparación entre las técnicas.

En concordancia con la literatura se observó un ligero pero significativo incremento de 1.13 a 2.71 veces en la expresión de GFP cuando se administraron los complejos RAd-NPMs, incluso en ausencia del imán ( $*p < 0.05$ ). Sin embargo, la incorporación de complejos RAd-NPMs al cultivo celular bajo influencia del campo magnético, mejoró sustancialmente la expresión de GFP cuando se la comparó con el grupo sin imán ( $\#p < 0.05$ ) y con el virus desnudo ( $* p < 0.05$ ).



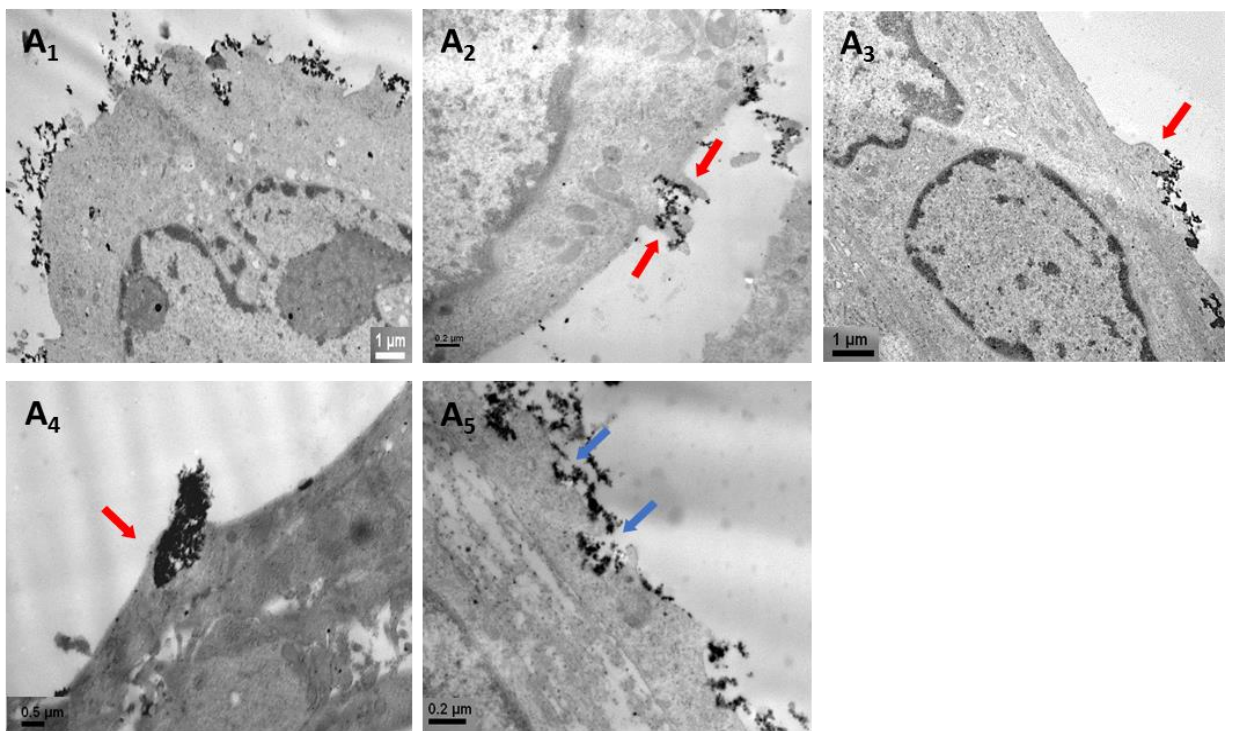
**Figura III.B.5. El campo magnético en un componente fundamental de la magnetofección.** Los mioblastos y miotúbulos de la línea celular C2C12 se incubaron con virus desnudo o con complejos RAd-NPMs y 48 horas después se evaluó la expresión de GFP. Se compararon grupos con y sin magneto para ambos tipos celulares. Los resultados se graficaron como fluorescencia absoluta (**A y B**) y relativa (**A' y B'**). La fluorescencia inespecífica proveniente de las células, las NPMs y el buffer de lisis fue sustraída de cada grupo previo al análisis de los datos. \* $p < 0.05$  entre virus desnudo y magnetoadenovectores con y sin magneto. # $p < 0.05$  entre magnetoadenovectores con y sin magneto. Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M.  $n=3$  para cada grupo; fgFe/PV = femtogramos de hierro por Partícula Viral.



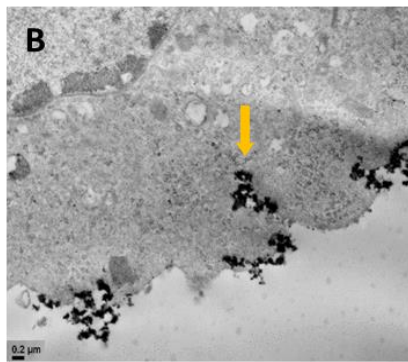
### ***III.B.6. Dinámica de la captación celular de los magneto-adenovectores.***

La captación y el tráfico intracelular de los complejos RAd-NPMs a diferentes tiempos se evaluó utilizando Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). El núcleo de óxido de hierro de las nanopartículas magnéticas PEIMag2 ofrece la densidad electrónica suficiente para permitir la observación sin necesidad de marcado de la muestra. Dentro de los primeros 15 minutos de exposición al campo magnético, se observó la distribución de los complejos RAd-NPMs sobre la superficie de los microtúbulos (**Figura III.B.6A<sub>1</sub>**) y diferentes procesos de endocitosis parecieron activarse simultáneamente. Varias proyecciones (**Figura III.B.6A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, flechas rojas**) e invaginaciones de membrana (**Figura III.B.6A<sub>5</sub>, flechas azules**) fueron perceptibles a ese tiempo. Al minuto 30, comenzó la formación de estructuras de tipo endosómico en la región subcortical de las células (**Figura III.B.6B**) y luego de 60 minutos, los complejos RAd-NPMs se visualizaron dentro de las células, llenando estructuras compatibles con vesículas citoplasmáticas (**Figura III.B.6C**). En algunos casos fue posible observar cerca de la superficie celular o asociadas a ésta, partículas adenovirales acompañadas de nanopartículas magnéticas (**Figura III.B.6D, flechas verdes**).

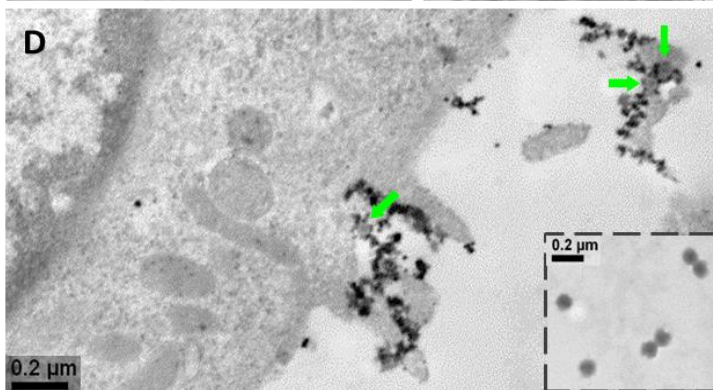
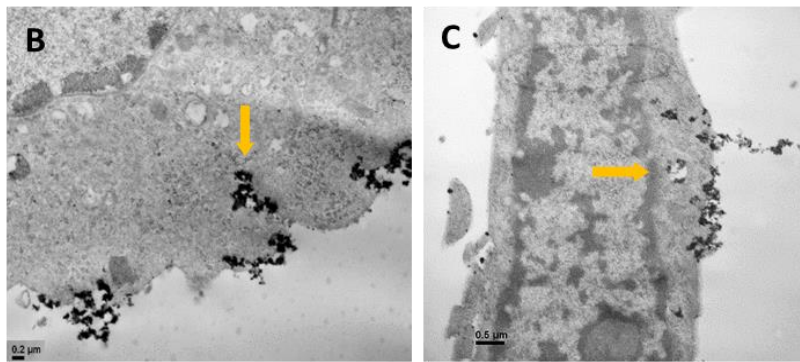
## 15 minutos



## 30 minutos



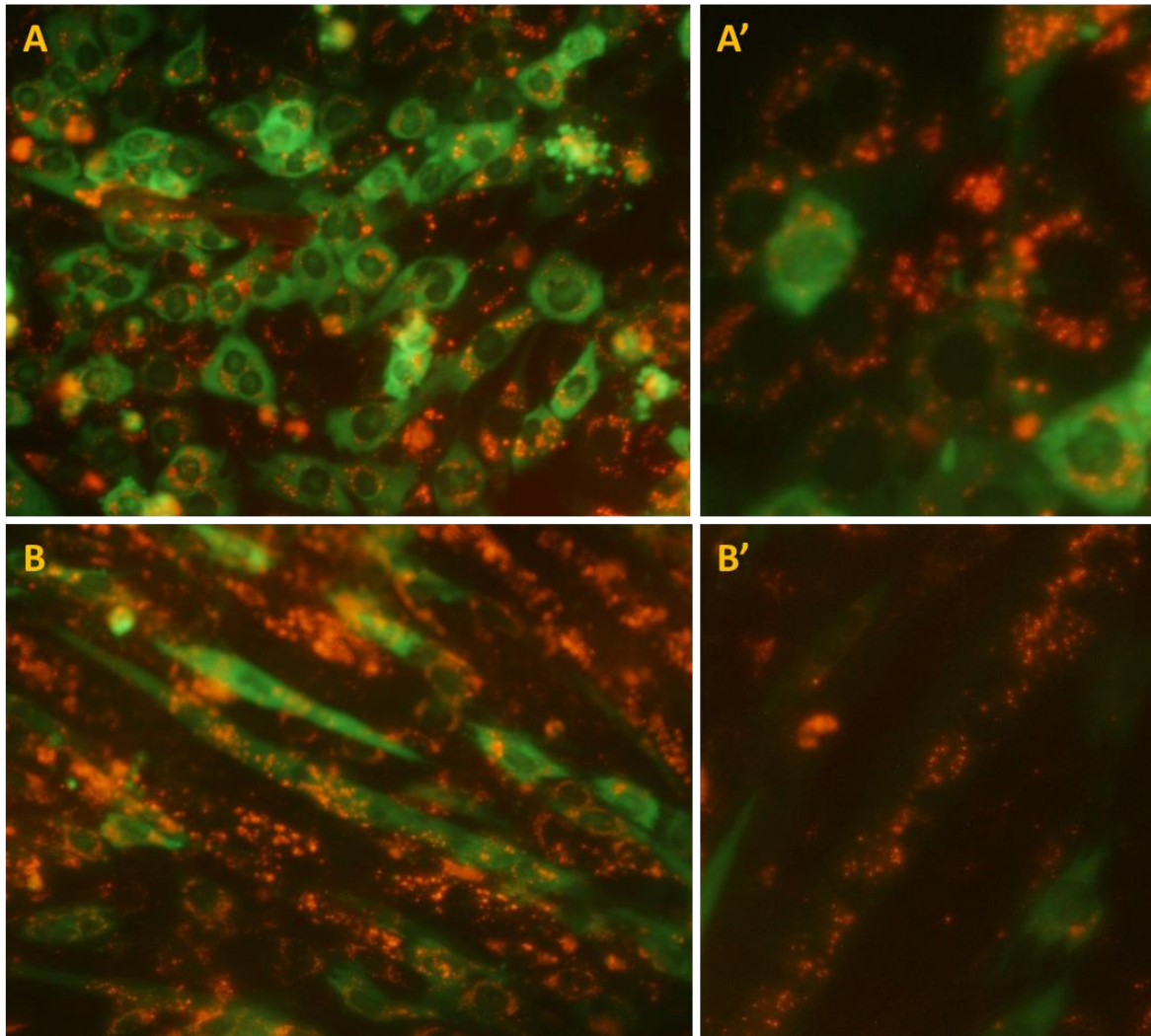
## 60 minutos



**Figura III.B.6. Incorporación de complejos RAD-NPMs en las células luego de la sedimentación magnéticamente inducida.** Se ensayó un protocolo de magnetofección en miotubulos completamente diferenciados de la línea C2C12. A continuación se tomaron imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) a distintos puntos en el tiempo luego de la

exposición al campo magnético. **(A<sub>1</sub>)** 15 minutos luego de la exposición al campo magnético. La imagen a menor magnificación muestra los complejos RAd-NPMs como estructuras negras, electron-densas distribuidas sobre la superficie celular; **(A<sub>2</sub>-A<sub>5</sub>)** las flechas rojas indican protrusiones de la membrana plasmática (simil-lamelipodios) y las flechas azules invaginaciones o *pits*. **(B)** Luego de 30 minutos, se evidenció el englobamiento y la internalización de los complejos RAd-NPMs (flechas naranjas). **(C)** 60 minutos después del comienzo de la exposición al campo magnético los complejos se visualizaron dentro de las células, englobados en vesículas citoplasmáticas (flechas naranjas). **(D)** Las flechas verdes señalan partículas adenovirales rodeadas de NPMs mientras son incorporadas por el miotúbulo. El panel en el ángulo inferior derecho muestra cómo se visualizan al MET los vectores adenovirales recombinantes.

El empleo de complejos RAd-NPMs ensamblados con NPMs fluorescentes (Atto500PEIMag2) permitió la visualización directa y simultánea de la expresión de GFP (codificada por el genoma viral) y la distribución de las nanopartículas (NPs). Como se muestra en la **figura III.B.7A y A'**, la fluorescencia verde y roja co-localizaron dentro del mismo mioblasto 48 horas después de la magnetofección. Mientras que la GFP mostró una distribución citoplasmática homogénea, la señal proveniente de las NPMs fue predominantemente perinuclear. Hallazgos similares se reportan aquí para los miotúbulos de la línea C2C12 (**Figura III.B.7B y B'**), donde la disposición intracelular de Atto550PEIMag2 se observó alrededor de prácticamente cada núcleo.



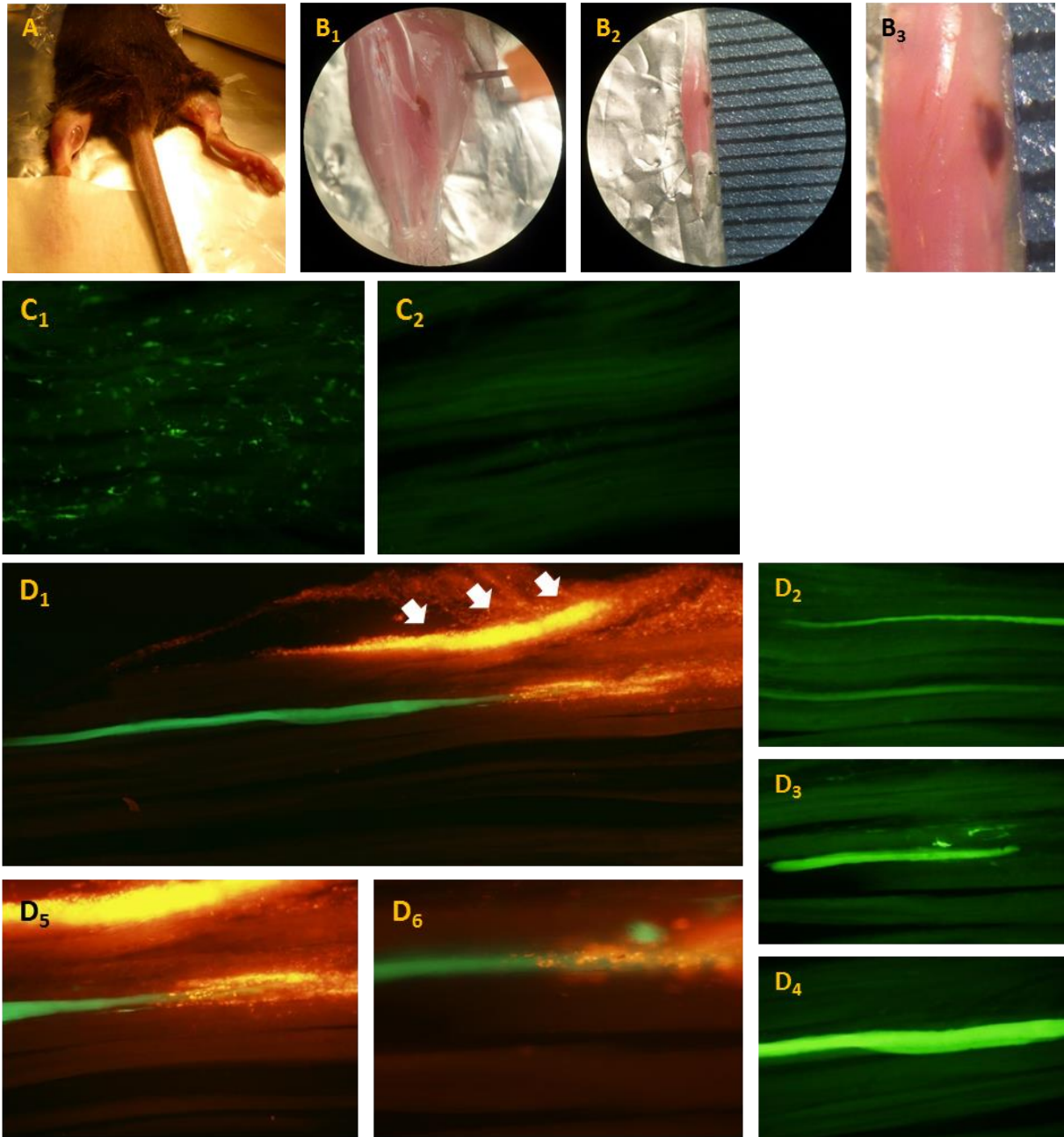
**Figura III.B.7. Destino y localización intracelular de los complejos RAd-NPMs.** Para permitir la visualización y el seguimiento intracelular los magnetoadenovectores se ensamblaron con NPMs fluorescentes y se les permitió ser incorporadas por mioblastos y miotubulos. Las imágenes fueron tomadas 48 horas después. **(A)** visualización simultánea en mioblastos de la expresión de GFP (codificada por el genoma viral) y de la presencia de Atto550PEI-Mag2, las nanoparticulas fluorescentes rojas. **(A')** Área con magnificación para mostrar la localización perinuclear de la fluorescencia roja. **(B)** Miotubulos maduros mostrando también la localización perinuclear predominante de las NPMs fluorescentes rojas. **(B')** Magnificación de los miotubulos mostrados en **(B)**.

### ***III.B.7. Magnetofección *in vivo* en músculo esquelético murino postnatal***

Nuestro protocolo de magnetofección se evaluó en ratones adultos C57BL/6 de 10 meses de edad. Como se describió previamente, se realizó un procedimiento quirúrgico menor en ambas patas traseras con el fin de acceder al músculo Sóleo y lograr la administración directa de los magneto-adenovectores (**figura III.B.8A**). La extremidad posterior derecha se inyectó únicamente con vectores adenovirales (RAd-GFP) y se empleó como control, mientras que en el Sóleo izquierdo se administraron los complejos RAd-NPMs y exponiéndolo luego a un campo magnético. Seis días después del procedimiento descrito, los ratones se eutanasiaron y los músculos Sóleo se extrajeron mediante delicada disección. La observación del músculo inyectado con los complejos RAd-NPMs reveló una gran área marrón debajo de la superficie, cercana al sitio donde posteriormente se colocó el imán (**figura III.B.8B<sub>1</sub> a B<sub>3</sub>**).

El análisis microscópico de un corte histológico de 20 micras demostró que la inyección del músculo con RAd-GFP resultó en la transducción únicamente de las células mononucleadas, sin miofibras positivas para GFP (**figura III.B.8C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>**), similar a lo reportado en nuestros resultados *in vitro*. La inyección de complejos RAd-NPMs, guiados luego por un campo magnético, mejoró el proceso de transducción permitiendo observar miofibras GFP+ (**figura III.B.8D<sub>1</sub> a D<sub>4</sub>**). Como se mencionó anteriormente, debido a las propiedades fluorescentes de las nanopartículas Atto550PEIMag2, fue factible evaluar la distribución y co-localización de estas con la GFP en el interior del músculo Sóleo (**figura III.B.8D<sub>5</sub> y D<sub>6</sub>**). Como se observa en la figura 8, a pesar que los complejos RAd-NPMs ingresaron exitosamente a un grupo de miofibras maduras, una gran parte de los mismos permanecieron agrupados en la periferia del músculo, por debajo del límite que marca el epimisio (**figura III.B.8D<sub>1</sub>, flechas blancas**). Esto refuerza la necesidad de continuar con la experimentación que permita encontrar mejores condiciones para la transferencia génica mediada por magneto-adenovectores.





**Figura III.B.8. Magnetofección *in vivo* en el músculo esquelético murino.** (A) Evaluamos nuestro protocolo de magnetofección *in vivo* en ratones C57BL/6 de 10 meses de edad. Ratón anestesiado y posicionado ventralmente y con ambos miembros traseros extendidos para poder acceder, incisión de piel y fascia mediante, al compartimiento muscular posterior. (B1, B2 y B3) Músculo Soleo de un ratón post-eutanasia seis días luego de la magnetofección. El mismo revela un área marrón cercana al sitio de inyección de los complejos. (C1 and C2) RAD-GFP inyectado en el músculo Soleo resultaron en la transducción de solo células mononucleadas. (D1, D2, D3, D4) Luego de aplicar el protocolo de magnetofección al músculo con complejos RAD-NPMs, se observaron algunas miofibras positivas para GFP. (D5 and D6) Co-localización de GFP y NPMs con fluorescencia roja dentro de la misma miofibrila.

### III.C DISCUSIÓN

La magnetofección *in vitro* ha sido exitosamente aplicada a múltiples sistemas biológicos y líneas celulares que tradicionalmente son consideradas como difíciles de transducir con vectores adenovirales desnudos, entre ellos: células de fibroblastos de ratón NIH-3T3 y de glioma de rata (**Sapet et al., 2012**), células cancerosas de mama (MCF7) y de melanoma de ratón (B16F10) (**Choi et al., 2015**), linfocitos primarios de sangre periférica humana (PBL16) (**Scherer et al., 2002**) y células humanas de carcinoma pancreático (EPP85-181RDB) (**Tresilwised et al., 2012**). Akiyama y colaboradores (**Akiyama, Ito, Kawabe, & Kamihira, 2010**) evaluaron la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en mioblastos de la línea C2C12 empleando la técnica de magnetofección *in vitro* utilizando liposomas catiónicos de magnetita (MCLs) asociados a vectores retrovirales. Este protocolo incrementó la eficacia de transducción aproximadamente 7 veces en comparación con el método convencional de infección retroviral. Más allá de estos estudios, la efectividad de la magnetofección en miotúbulos maduros completamente diferenciados no había sido estudiada hasta el momento.

Los resultados que presentamos en esta tesis doctoral demuestran que la conjugación de vectores adenovirales recombinantes (RAAd) con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (NPMs) para formar magneto-adenovectores puede superar la baja tasa de infección por parte de los miotúbulos y aumentar significativamente la sobreexpresión génica mediada por un adenovirus recombinante en células musculares esqueléticas maduras.

Primero describimos cómo la transducción de miotúbulos maduros de la línea celular C2C12 utilizando solo RAAd-GFP alcanza una expresión significativamente menor a la obtenida en mioblastos transducidos en las mismas condiciones. Este fenómeno observado por nosotros puede explicarse por la pérdida del receptor de superficie CAR que durante el proceso de maduración y diferenciación del músculo esquelético. Entre otras funciones en la migración y fusión celular, dicho receptor permite el ingreso de los Coxsackievirus y Adenovirus (**Nalbantoglu et al., 1999**).

Debido a que la magnetofección está basada en mecanismos que no dependen de receptores de membrana para el ingreso al interior celular (**Scherer et al., 2002**) decidimos evaluar si la conjugación de RAAd-GFP o RAAd-IGF-1 con NPMs (PEIMag2) podría mejorar la transferencia de genes a células del músculo esquelético bajo la influencia de un campo magnético. Como se mencionó previamente, el potencial electroquínético negativo de las

partículas adenovirales en medios acuosos permite su ensamble con especies catiónicas de NPMs como las recubiertas con PEI debido a la agregación inducida electrostáticamente. Los datos disponibles sobre el análisis de la interacción RAd-NPMs mostraron que la eficacia en la formación de complejos en ausencia de suero depende principalmente de las cantidades relativas de NPMs y partículas virales (PV). Así, seleccionamos para nuestros experimentos una relación NPM-a-PV de 1.5 y 2.5 fgFe/PV basados en publicaciones previas que indican que esta relación permite alcanzar exitosamente una tasa de formación de complejos del 75-80% (Tresilwised et al., 2012).

La infección de miotúbulos de la línea C2C12 mediada por RAd-GFP+PEIMag2 en presencia de un campo magnético aumentó unas 23 veces la expresión de GFP en comparación a la infección convencional con RAd-GFP. Estos resultados demuestran también que la conjugación de RAd con NPMs no presenta ningún efecto deletéreo sobre el desempeño de los adenovirus recombinantes como vectores de transferencia génica. Resultados similares se obtuvieron en mioblastos encontrándose niveles de GFP 13 veces mayores con el empleo de la técnica de magnetofección.

Debido a que el músculo esquelético es frecuentemente elegido como un sitio de producción ectópica de moléculas de secreción con funciones parácrinas y endócrinas (**Goldspink, 2003**) o con propiedades antigénicas (vacunas), evaluamos el potencial de la magnetofección como método de transferencia para gen del IGF-1 en miotúbulos maduros de la línea C2C12. Después de la incubación con RAd-IGF-1+PEIMag2 y la exposición al campo magnético, los niveles del factor de crecimiento IGF-1 secretado en el medio de cultivo fueron 4 veces mayores que los conseguidos con RAd-IGF-1 solamente. Teniendo en cuenta que la síntesis y exocitosis de IGF-1 son procesos altamente organizados y dependientes de energía (**Daughaday & Rotwein, 1989**), podemos inferir indirectamente que la viabilidad celular no se afectó durante la magnetofección.

Ha sido descripto que las NPMs pueden influir en la captación celular de vectores de transferencia génica incluso en ausencia de un campo magnético (**Prijic et al., 2010; Tresilwised et al., 2012**). En concordancia con la literatura, nosotros describimos para mioblastos y miotúbulos sometidos a un protocolo de magnetofección sin exposición al imán, un aumento leve pero significativo (1.13 a 2.71 veces) en la eficacia de transducción de los complejos RAd-GFP+PEIMag2 respecto de la infección con RAd-GFP desnudo. Esto podría ser explicado por la sedimentación espontánea, no asistida magnéticamente, de los magneto-adenovectores sobre la monocapa de células debido a su mayor tamaño comparado



con las partículas virales no asociadas con NPMs. Una vez sedimentados, la acumulación de complejos en estrecho contacto con la membrana plasmática celular desencadenó su internalización. Sin embargo, la comparación entre los grupos *sin imán* y *con imán*, demostró que el campo magnético es un componente importante de la magnetofección ya que la exposición al mismo aumentó significativamente la transducción de las células musculares C2C12, probablemente por aumento en la magnitud de la sedimentación y acortamiento de los tiempos requeridos para la interacción con la membrana plasmática. Estos factores podrían entonces aumentar la tasa de internalización y posterior expresión del gen de interés transferido por el vector viral.

La captación celular de nanopartículas (NP) está mediada por diferentes tipos de endocitosis que tienen lugar simultáneamente en una misma célula (**Bregar, Lojk, Sustar, Veranic, & Pavlin, 2013; El-Sayed & Harashima, 2013; Hillaireau & Couvreur, 2009; Oh & Park, 2014**). El bloqueo selectivo de las diferentes vías de internalización en las células RAW264.7 (simil-macrófago) reveló que las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro recubiertas con ácido dimercaptosuccínico (DMSA-SPIONs) se internalizan por endocitosis mediada por clatrina y caveolina (EMC), así como por macropinocitosis, una forma de internalización receptor-independiente (**Gu et al., 2011**).

Recientemente, Poussard y col., reportaron que en mioblastos de la línea C2C12, las nanopartículas de sílice se internalizan principalmente por EMC, correlacionándose esto con altos niveles de expresión del gen de interés (**Poussard et al., 2015**). Resultados similares se obtuvieron en células humanas mesoteliales y de melanoma y en fibroblastos de ratón expuestos a NPMs recubiertas de sílice (**Prijic et al., 2010**). La internalización de NPMs recubiertas con PEI, análogas a las utilizadas en nuestro estudio, se analizó intensamente en cultivos de células COS-7, SPC-A1, HeLa, HEP-G2 y células BEAS-2B demostrando que siguen las mismas vías endocíticas (**Huth et al., 2004; Ma, Zhang, Wang, Xia, & Gu, 2011**).

En las imágenes que obtuvimos por MET, los miotúbulos incubados con RAd+PEI-Mag2 en presencia de un campo magnético mostraron alteraciones de la membrana plasmática compatibles con las descritas anteriormente para los procesos endocíticos. Poco después de la exposición a los magneto-adenovectores, observamos la formación de protuberancias del sarcolema hacia el medio externo compatibles con estructuras tipo lamellipodios y “*ruffles*” y, en menor medida, invaginaciones de membrana o “*pits*”. Todas estas estructuras podrían ser indicadoras de macropinocitosis activa y EMC. Transcurridos unos 60 minutos desde el

momento inicial de la magnetofección, los complejos se visualizaron dentro de las células, en vesículas citoplasmáticas que podrían corresponder a endosomas tempranos o macropinocitosis. Cabe mencionar que, como se reportó en la literatura (**Akinc & Battaglia, 2013**), pareciera existir una correlación entre el tamaño de los agregados RAd-NPMs y la vía de internalización, ya que las estructuras de membrana compatibles con macropinocitosis se observaron con más frecuencia rodeando grandes conglomerados del material electrón-denso correspondiente a los complejos RAd-NPMs.

A fin de obtener más detalles sobre el destino intracelular de los magneto-adenovectores, decidimos utilizar NPMs fluorescentes (Atto500PEI-Ma2) para el ensamblado de los complejos RAd-NPMs. Esto nos permitió visualizar, en simultáneo, la expresión de GFP (codificado por el genoma viral) y la localización de las nanopartículas dentro de los mioblastos y miotúbulos. Así, 48 horas después de llevar a cabo el protocolo de magnetofección, observamos agregados de NPMs sin conjugar y/o de complejos RAd-NPMs como un claro patrón puntiforme rojo de localización predominantemente perinuclear. Nuestros resultados concuerdan con los mecanismos de internalización propuestos para este tipo de complejos y con la distribución centrípeta clásica de aquellas vesículas interiorizadas que se encuentran en las últimas etapas de la vía endosómica-lisosomal. Hallazgos similares fueron descritos en mioblastos de la línea C2C12 transfectados con complejos de ADN-polímeros catiónicos marcados con rodamina en los que se observó un patrón puntiforme perinuclear luego de la endocitosis (**Billiet et al., 2012**). Otras formulaciones de NPMs cubiertas con PEI también mostraron un patrón de localización intracelular similar después de la internalización celular (Chorny et al., 2007; Maiolino et al., 2015).

Más allá del mecanismo de ingreso a la célula, para que un vector de transferencia génica sea verdaderamente eficaz debe ser capaz de escapar de la vía endosómica-lisosomal antes de que ocurra su degradación. Aquellos sistemas de transferencia génica, naturales o artificiales, que son capaces de realizar "escape endosomal", poseen una mayor eficacia en comparación con los sistemas de entrega directa al citosol (micro inyección o electroporación) o con formulaciones incapaces de inducir la ruptura del endosoma-lisosoma (**Chang, Higuchi, Kawakami, Yamashita, & Hashida, 2010; Kloeckner et al., 2006**). En el caso del adenovirus de tipo salvaje y de vectores adenovirales recombinantes, la interacción con el receptor de superficie específico (CAR) desencadena la endocitosis mediada por clatrina seguido del escape endosomal, el transporte citoplásmico y finalmente

la translocación del ADN al núcleo. Simultáneamente, se induce la macropinocitosis debido a la presencia de partículas virales en la superficie celular (**Meier et al., 2002; Meier & Greber, 2004**).

En el caso de las nanopartículas y los complejos NPs-ácidos nucleicos, especialmente aquellas formulaciones recubiertas de PEI, se ha descrito un mecanismo particular para escapar a la degradación lisosomal (**Bakhru et al., 2012; Gujrati et al., 2014; F. Wang et al., 2015**) denominado “esponja de protones (proton sponge)” (Behr, 1997). En su trabajo, Behr describe cómo ciertas poliaminas como PEI pueden absorber protones libres en el interior de los endosomas/lisosomas promoviendo consecuentemente la acumulación de los mismos (mediante un mecanismo dependiente de la H<sup>+</sup>-ATPasa) y el aumento en el potencial de membrana más allá del nivel de equilibrio. Esto desencadena la difusión de aniones cloruro y moléculas de agua, aumentando más aún la presión osmótica dentro del endosoma/lisosoma y generando eventualmente la ruptura del mismo. Por otra parte, el ambiente ácido dentro de los compartimentos degradativos favorece la disociación de los componentes cargados negativamente (como los ácidos nucleicos o partículas adenovirales) de las NPs recubiertas con PEI cargadas positivamente, permitiendo así que el ADN o ARN libres pueda alcanzar el citosol.

Publicaciones recientes sugieren que los complejos ADN-NPs que son capaces de acceder al citoplasma puede ser re-captados por autofagosomas, generando así un atrapamiento endosomal "a largo plazo" (**Remaut, Oorschot, Braeckmans, Klumperman, & De Smedt, 2014**). Aunque restan por realizarse nuevos y más completos experimentos, consideramos que nuestros magneto-adenovectores podrían estar involucrados en un mecanismo similar. La re-captura de los complejos RAd-NPMs libres después del primer escape endosomal podría explicar la localización punteada perinuclear 48 horas después de que la mezcla inicial de incubación se retiró del sistema. Por otro lado, la alternancia entre ciclos de escape endosomal e incorporación vía autofagocítica podría contribuir también a una presencia más prolongada de los complejos de RAd-NPMs dentro de las células, creando pequeñas "ondas" de liberación y expresión del gen similar a un sistema de tipo “*mini-bomba de infusión*”. Al respecto, mostramos aquí que RAd-IGF-1+PEI-Mag2 logró una expresión elevada más sostenida en el tiempo que RAd-IGF-1 sólo cuando incorporados a un cultivo de miotúbulos maduros.

Independientemente del mecanismo exacto que gobierna la internalización celular y el escape endosomal, mostramos aquí que la conjugación de adenovirus recombinantes con

PEI-Mag2 para formar magneto-adenovectores, mejora la capacidad de transferencia génica adenoviral en miotúbulos de la línea C2C12, observando una eficaz expresión del gen de interés.

Mientras que *in vitro* la magnetofección se ha convertido en una tecnología altamente exitosa para la transferencia génica en cuantiosos y diferentes escenarios **(Plank et al., 2011)**, las aplicaciones *in vivo* todavía representan un desafío. Cuando se aplican a los tejidos animales, los complejos con nanopartículas se encuentran con un significativo conjunto de barreras para la penetración, movilidad y distribución luego de la administración **(Lane, Qian, Smith, & Nie, 2015)**. Además, el perfil de seguridad de las formulaciones de NPs necesita cumplir con los requisitos para la utilización biomédica. En el caso particular de las NPMs, la selección de un óptimo campo magnético externo es crítica para producir la migración y distribución deseada (magnetoforesis) dentro del tejido de los magneto-adenovectores.

A pesar de muchos obstáculos, la magnetofección ha sido utilizada *in vivo* para mejorar la transferencia génica mediada por vectores virales o por plásmidos a los tejidos de origen animal como cerebro de ratón **(Hashimoto & Hisano, 2011; Sapet et al., 2012; Soto-Sanchez et al., 2015)**, músculo esquelético **(Zhou et al., 2007)**, y tumores hepáticos **(Almstatter et al., 2015)**. Nuestros resultados señalan cómo la administración de magneto-adenovectores seguida por la exposición a un campo magnético externo, mejoró la transducción del músculo Sóleo en ratones adultos C57BL/6. Mientras RAd-GFP solo, sin NPMs, no logró transducir ninguna fibra muscular, la conjugación con Atto550PEI-Mag2 y la posterior exposición a un campo magnético externo produjo la visualización de miofibras GFP positivas luego de 7 días desde la inyección. Aunque los magneto-adenovectores se inyectaron en la zona central del músculo Sóleo, después de que la magnetoforesis se llevó a cabo, la mayor parte de los complejos RAd-NPMs pudo visualizarse en un área de reducidas dimensiones debajo de la superficie del músculo y en las proximidades de la posición original del imán externo. Este fenómeno podría ser debido a un campo magnético de alta intensidad y/o prolongado tiempo de exposición que generó una fuerte atracción a través del tejido. Resultados similares se reportaron en la literatura después de aplicar magnetofección en el músculo esquelético **(Zhou et al., 2007)** y en un modelo de carcinoma hepatocelular de rata **(Almstatter et al., 2015)**. Esto resalta la necesidad de generar mejoras importantes en el sistema para lograr una distribución homogénea de los magneto-adenovectores en todo el tejido/órgano.

Podemos concluir entonces que (1) la transducción *in vitro* de miotúbulos maduros de la línea celular C2C12 utilizando solo vectores adenovirales (RAd) alcanza una expresión significativamente menor a la obtenida en mioblastos transducidos en las mismas condiciones; (2) la conjugación de vectores adenovirales recombinantes (RAd) con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (NPMs) para formar magneto-adenovectores puede superar la baja tasa de infección por parte de los miotúbulos y aumentar significativamente la sobreexpresión génica mediada por un adenovirus recombinante en células musculares esqueléticas maduras; (3) el campo magnético externo es un componente importante de la magnetofección ya que la exposición al mismo aumenta significativamente la transducción de las células musculares C2C12, probablemente por aumento en la magnitud de la sedimentación y acortamiento de los tiempos requeridos para la interacción con la membrana plasmática; (4) la administración de magneto-adenovectores seguida por la exposición a un campo magnético externo, mejora la transducción *in vivo* del músculo Sóleo en ratones adultos C57BL/6.

### III.D MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1) **Ámbito del estudio.**

La serie de experimentos que componen el presente capítulo fue realizada por la tesista en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “*Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner*”, CONICET-UNLP, La Plata, BA, Argentina. Las colaboraciones realizadas por otros investigadores/centros se señalan oportunamente.

#### 2) **Cultivos celulares de Miotúbulos y Mioblastos.**

La línea celular de mioblastos murinos C2C12 (ATCC<sup>®</sup> Number CRL-1772) se cultivó en medio DMEM de alta-glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (medio de proliferación). Cuando las células alcanzaron un 70-80 % de confluencia, se indujo su diferenciación y fusión a miotúbulos multinucleados reemplazando el medio de proliferación a DMEM con 2% de suero de caballo (medio de diferenciación). Luego de 6 días, las células se infectaron de acuerdo al protocolo de transferencia génica *in vitro* descrito a continuación. Los reactivos utilizados fueron de Gibco<sup>®</sup> y Sigma-Aldrich<sup>®</sup> y las placas de cultivo de Corning<sup>®</sup>.

#### 3) **Nanopartículas magnéticas (NPMs) y aplicadores de campo magnético.**

*Los procedimientos y mediciones que aquí se describen fueron realizados en colaboración con la Dra. Olga Mykhaylyk (Institute of Immunology and Experimental Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Munich, Germany) y con el Dr. Francisco H. Sánchez (Instituto de Física La Plata, CONICET-UNLP).*

Para la formulación de los complejos Vector Adenoviral-Nanopartículas Magnéticas (RAd-NPMs), se usaron partículas con un recubrimiento superficial de polietilenimina ramificada de 25-kDa (PEI-25<sub>BR</sub>) combinada con el agente tensioactivo fluorado ZONYL<sup>®</sup> FSA (litio 3- [2- (perfluoroalquil) etiltio] propionato), en lo sucesivo denominado PEI-Mag2 (**Sanchez-Antequera, Mykhaylyk, Thalhammer, & Plank, 2010**). Las suspensiones acuosas de NPMs se esterilizaron usando radiación gamma con <sup>60</sup>Co a una dosis de 25 kGy. La concentración de NPMs se determinó en función del contenido de hierro del nanomaterial seco y en suspensión acuosa (**Mykhaylyk, Antequera, Vlaskou, & Plank, 2007**). Las partículas contenían 560 mg Fe/g de peso seco. Los tamaños promedios del núcleo de óxido

de hierro se calcularon a partir de la ampliación de los picos de difracción de rayos X utilizando la fórmula de Scherrer. Las propiedades magnéticas estáticas de las partículas se evaluaron mediante la medición de la magnetización cuasi-estática en los campos DC aplicados (o M (H)) utilizando un susceptómetro comercial MPMS (Quantum Design, EE.UU.). El marcado de las nanopartículas magnéticas PEI-Mag2 con un recubrimiento que comprende PEI se realizó utilizando Atto550 NHS éster (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen, Alemania) en un buffer Na-borato 0.1 M, pH 8.5, seguido por diálisis contra agua usando un dispositivo de diálisis tipo cassette, con un punto de corte de peso molecular (PM) de 3.500 (Vlaskou, Plank, & Mykhaylyk, 2013).

Para los protocolos de magnetofección *in vitro* se utilizó una placa comercial para generar el campo magnético requerido para la sedimentación de los magneto-adenovectores (Oz Biosciences®, Marsella, Francia). Dicha placa se compone de imanes cilíndricos permanentes de Nd-Fe-B y genera una densidad de flujo magnético 0.3 T y un gradiente de 67-123T/m en un sistema de cultivo celular en monocapa. Para la aplicación de magnetofección *in vivo* en ratones C57BL/6 adultos, se utilizó una combinación de dos imanes cilíndricos que fueron posicionados directamente sobre la extremidad posterior del ratón, proporcionando una densidad magnética en la superficie del imán de 430 mT y un gradiente medio de 18 mT/ mm dentro del primer centímetro.

#### 4) Vectores adenovirales recombinantes RAd-IGF-1 y RAd-GFP

Un vector adenoviral recombinante (RAd) conteniendo el gen del IGF-1 de rata (RAd-IGF-1; gen IGF-1 gentilmente donado por el Dr. Peter Rotwein, Oregon Health Sciences University) se construyó en nuestro laboratorio mediante una variante del método de los dos plásmidos (Bett, Haddara, Prevec, & Graham, 1994) empleando el kit de plásmido AdMAX (Microbix, Ontario, Canadá). Brevemente, el ADNc para el gen de IGF-1 de rata (obtenido a partir del ARNm para la forma precursora IGF-1b) (Daughaday & Rotwein, 1989) se escindió a partir del plásmido pBluescript KS, se subclonó en pCA14 y se insertó en el sitio de clonación múltiple del plásmido lanzadera pDC515, que contiene un cassette de expresión que consiste en el promotor de citomegalovirus de ratón (CMV) y la señal de poliadenilación del virus de simio 40, inmediatamente *aguas arriba* y *aguas abajo*, respectivamente, del sitio de clonación múltiple. El segundo plásmido del kit, el pBHGfirt o plásmido genómico (del) E1,3 FLP, se compone de la totalidad del genoma de adenovirus 5, con deleciones en las regiones E1 y E3. En células HEK293 cotransfectadas, en las cuáles

se expresa la FLP recombinasa, se produce la recombinación específica de lugar del cassette de expresión del pDC515 en pBHGfrt (del) E1,3 FLP, generando así el genoma del vector RAd-IGF-1. El RAd así generado se amplificó en células HEK293 de las cuales se aisló luego por lisado celular. Posteriormente se purificó por ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Las reservas o stock virales finales se titularon por dilución seriada en placa. Otro vector adenoviral, el RAd-GFP, se construyó en nuestro laboratorio siguiendo los procedimientos generales descriptos anteriormente. El mismo porta un gen híbrido que codifica la proteína verde fluorescente *Aequorea Victoria* (GFP) mejorada bajo el control del promotor de CMV de ratón. El vector se amplificó en células HEK293, se purificó y tituló como fuera descripto para RAd-IGF-1.

#### **5) Autoensamblado de magneto-adenovectores y transferencia de genes *in vitro*.**

Para la transducción *in vitro*, se usaron relaciones NPM-a-Partícula Viral de 1.5 y 2.5 fentogramos de hierro por Partícula Viral física (PV), denominado en adelante como fgFe/PV, (Tresilwised et al., 2012). Experimentos previos revelaron que una multiplicidad de infección (MOI) de 60 partículas virales por célula produce una buena tasa de infección en esta línea celular y por lo tanto se seleccionó esta MOI para el protocolo de transducción. Los magneto-adenovectores (RAd-PEI-Mag2) utilizados para la transducción *in vitro* fueron ensamblados en relaciones NPM-a-PV de 1.5 o 2.5 fgFe/PV mediante la mezcla de una suspensión de nanopartículas PEI-Mag2 conteniendo 11.25 o 18.75 gFe/ml en buffer fosfato salino (PBS), con un volumen igual de la dilución de adenovirus que contenía  $7.5 \times 10^9$  partículas virales físicas por ml de DMEM sin aditivos. Después de la incubación de la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente se midieron las características físicas de los complejos resultantes.

Los mioblastos y miotúbulos se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de  $\approx 1,2 \times 10^5$  células/pocillo resultando en aproximadamente 250.000 células por pocillo 24 horas después de la infección. Para la transducción, se añadieron 400  $\mu$ l de los complejos en cada pocillo. Inmediatamente después, la placa de cultivo se colocó sobre la placa magnética exponiéndose así al campo magnético durante 30 min, excepto para los experimentos sin imán. Después de este tiempo de incubación, la mezcla de magneto-adenovectores se reemplazó con medio de cultivo fresco.



Como referencia para la evaluación posterior de la eficacia, un subgrupo de células se infectó con una dilución de virus desnudos (RAd) conteniendo el mismo número de partículas infecciosas que en el protocolo de magnetofección.

#### **6) Transferencia génica *in vivo* asistida por magneto-adenovectores**

La magnetofección *in vivo* se realizó en ratones hembra C57BL/6 de 10 meses de edad. El magneto-adenovector RAd-GFP-Atto550PEI-Mag2 se preparó a una relación NPM-a-PV de 4 fgFe/PV. Para esto, 9.8  $\mu$ l de la suspensión de nanopartículas Atto550-PEIMag2 (que contienen 4,3 mgFe) se mezclaron con 0.2  $\mu$ l de RAd-GFP (conteniendo  $10^9$  partículas virales físicas o  $10^7$  partículas virales infectivas, *p.f.u*) en solución salina normal estéril (NaCl al 0,9%). Después de incubarse la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir el ensamblado del complejo, 10  $\mu$ l de la misma se inyectó en el músculo Sóleo de los ratones como se describe a continuación. Una fracción de los complejos se diluyó en 500 $\mu$ l de solución salina normal y se utilizó para la caracterización física de los mismos.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilazina (90/10 mg/kg de peso) por vía intraperitoneal (i.p.) y colocados ventralmente en una superficie acondicionada con las extremidades inferiores extendidas y suavemente inmovilizadas. El pelo que cubre la parte posterior y la región externa de ambos miembros traseros se removió y la piel se desinfectó con povidona yodada. A continuación, se realizó una incisión de 1 cm de largo para acceder al compartimento muscular posterior y luego de una delicada disección de la fascia y el tejido conjuntivo, se identificó el músculo Sóleo izquierdo. El mismo se inyectó en su parte media o vientre, con 10  $\mu$ l de la suspensión de magneto-adenovectores usando una jeringa Hamilton®. Inmediatamente, la fascia muscular y la piel se suturaron y toda la extremidad posterior fue expuesta a un campo magnético externo durante 30 minutos. El músculo Sóleo contralateral derecho sirvió como control y se inyectó sólo con el vector adenoviral desnudo RAd-GFP. Seis días después del procedimiento los ratones se eutanasiaron por dislocación cervical. Los músculos se removieron inmediatamente, se fijaron (4% PFA durante 24 horas a 4 ° C), se criopreservaron por gradiente de sacarosa (0,25 M de sacarosa en PBS durante 1 h, sacarosa 0,5 M en PBS durante 45 min y, finalmente, 1.5 M de sacarosa en PBS durante 30 min), se incluyeron en medio de congelación de tejido (Cryoplast®, Biopack, Argentina) y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los bloques de tejido así obtenidos se almacenaron a -80 °C hasta su

procesamiento posterior. Se obtuvieron secciones longitudinales de 20 micras de espesor y se montaron sobre un portaobjetos de vidrio con medio de montaje para fluorescencia (Fluoromount G™, Electron Microscopy Sciences, PA, USA). Los cortes se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia cuyas características se describen más adelante en la presente sección.

Todo el trabajo experimental desarrollado con animales de laboratorio se realizó en cumplimiento de las normas impuestas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la FCM, UNLP.

### 7) Caracterización de los magneto-adenovectores

*Los procedimientos y mediciones que aquí se describen fueron realizados en colaboración con la Dra. Olga Mykhaylyk (Institute of Immunology and Experimental Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Munich, Germany).*

Se determinó el diámetro hidrodinámico medio ( $D_h$ ) y el potencial electroquinético  $\zeta$  de las NPMs y de los magneto-adenovectores por espectroscopia de correlación de fotones (PCS) usando un Malvern Zetasizer Nano Serie 3000 HS (UK). La eficacia del ensamblado del virus con las nanopartículas magnéticas y la estabilidad de los complejos se evaluaron utilizando adenovirus marcado con  $I^{127}$  como se describe en detalle en la ref. **(Tresilwised et al., 2012)**. Brevemente, las partículas adenovirales se marcaron con  $I^{127}$  y se combinaron con nanopartículas PEI-Mag2, en PBS o en SFB, a diferentes relaciones NPM-a-PV durante 30 min y luego se expusieron a la placa magnética durante 30 minutos; la radioactividad no sedimentada se midió en el sobrenadante. Para evaluar la velocidad de migración de los magneto-adenovectores en gradientes de campos magnéticos (velocidad magnetofóretica) se registró la cinética de clarificación de las suspensiones por medición de perfiles de extinción de espacio y tiempo utilizando un dispositivo LUMiReader® equipado con un conjunto de imanes permanentes según lo descrito recientemente por Mykhaylyk y col. **(Mykhaylyk O., 2015)**. Los cambios de concentración fueron detectados por varios perfiles de extinción tomados a intervalos de tiempo de 1 segundo con una resolución espacial de 30 micras y a una longitud de onda de 410 nm estando los imanes de neodimio-hierro-boro posicionados debajo de la cubeta como se muestra en la figura 1C. A partir de los perfiles de extinción que se muestran en la figura 1C la extinción integral  $E$  se calculó promediando sobre una región seleccionada de los perfiles entre el menisco y el fondo de la cubeta y, la extinción

relativa  $E/E_0$  se determinó y se graficó en función del tiempo; aquí  $E_0$  es la extinción inicial de la muestra. En el intervalo lineal de la ley de Lambert-Beer, la extinción relativa  $E_{rel}$  puede ser considerada como una concentración relativa y representa la tasa de los complejos que quedan en suspensión. La velocidad magnetoforética eficaz de partículas se calculó como  $v = \langle L \rangle / t$ , aquí  $\langle L \rangle$  es un camino medio de las partículas luego de la magnetoforesis. Con una altura de muestra de 8 mm (375  $\mu$ l),  $\langle L \rangle = 4$  mm. La concentración relativa  $E/E_0$  graficada contra la velocidad magnetoforética  $v$  representa una función de distribución acumulada  $\Phi(v)$ , que describe el radio de la partícula que tiene una velocidad magnetoforética  $v_l$  menor o igual al valor  $v_l$ . Se calcularon los valores medios de momento magnético  $M$  del complejo y el número de nanopartículas magnéticas por complejo  $N = M/m_{eff}$  se calculó como se describiera en Wilhelm et. al. (Wilhelm, Gazeau, & Bacri, 2002). Aquí  $m_{eff} = 8.7 \times 10^{-20}$  Am<sup>2</sup> es un momento magnético efectivo del núcleo de las nanopartículas que representa el diámetro medio del núcleo de magnetita de 9 nm y la saturación de magnetización de 62 emu/g de hierro.

### **8) Adquisición de imágenes fluorescentes**

Las imágenes de células en cultivo se obtuvieron utilizando una cámara Olympus® Digital (E-330) conectada a un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus® IX71) con una lente objetivo de 20X (Olympus® Objective Lens LUCPLFLN 20XPH/NA 0.45). Los cortes de tejido se analizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus (Olympus BX-51®; Olympus® Objective Lens Plan and UPlanFL N) equipado con una cámara CCD DP70 Video (Olympus, Tokio, Japón). El procesamiento de las imágenes se realizó con el software Image-Pro® Plus (versión 5.1.2, MediaCybernetics, Inc).

### **9) Cuantificación de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP).**

Dos días después de la transducción, los cultivos de mioblastos y miotúbulos se lavaron dos veces con buffer PBS y luego se incubaron con 150  $\mu$ l/pocillo de buffer de lisis pre-enfriado durante 30 minutos a 4 ° C (0,1 % Triton X-100 + EDTA 1 mM en PBS). Los lisados resultantes se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos y los sobrenadantes se analizaron usando un lector de microplacas multimodo (Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detector) a longitudes de onda de excitación y emisión de 485/20 y 535/25 nm, respectivamente. Para asegurar la validez de la comparación entre valores obtenidos de los

distintos métodos de transferencia de genes ensayados, las lecturas de fluorescencia inespecíficas provenientes de células solas, nanopartículas magnéticas y buffer de lisis se restaron previo al análisis de los datos. Los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia.

#### **10) Medidas de IGF-1**

Con el fin de cuantificar la producción de IGF-1, el sobrenadante proveniente de cultivos de miotúbulos infectados con RAd-IGF-1 se recogió 48 hs después de la transducción viral con o sin magnetofección y se almacenó a -80 °C hasta la realización del radioinmunoensayo (RIA). El IGF-1 de las muestras se extrajo por crio-precipitación ácido-etanólica (**Breier, Gallaher, & Gluckman, 1991**). El IGF-1 humano recombinante (rhIGF-1, Chiron Corp., Emeryville, CA) se yodinó siguiendo el método Iodogen (**Fraker & Speck, 1978**). El rhIGF-1 marcado con I<sup>125</sup> se purificó mediante cromatografía de exclusión en una columna PD-10 Sephadex G-25 M (Cat. Núm. 17-0851-01, GE Healthcare Bio-Sciences, PA, USA). El eluato correspondiente al monómero rhIGF-1 se recogió, se midió su radioactividad y luego se almacenó en alícuotas a -20 °C previa adición de glicerol. Este material se usó dentro de las 2 semanas de la yodinación y cuando fue necesario, se realizó el ajuste teórico de las cuentas por minuto (c.p.m) debido a la desintegración del isótopo. El anticuerpo anti-rhIGF-1 (AFP4892898) fue un regalo del Dr. AF Parlow (Nacional hormonal y el Programa de péptidos, Torrance, CA). Debido a que la secuencia de aminoácidos de IGF-1 de rata difiere de IGF-1 humana por tan sólo 3 de 70 residuos en las posiciones 20, 35 y 67 (**Shimatsu & Rotwein, 1987**) es factible detectar rIGF-1 utilizando anticuerpo anti-humano (**P. D. Lee, Baker, Liu, Kwan, & Hintz, 1996**). El anticuerpo secundario (antisuero anti-conejo hecho en cabra) se obtuvo en colaboración con la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

#### **11) Adquisición de imágenes de microscopía electrónica de transmisión**

*La técnica que aquí se describe fue realizada por el Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata.*

Los mioblastos y miotúbulos fueron sembrados en placas de cultivo de 12 pocillos ( $2,4 \times 10^5$  células/pocillo). Los protocolos de transducción y magnetofección se ejecutaron como se describió previamente. Finalizado el período de incubación, se retiraron las mezclas RAd o RAd-NPMs y las monocapas celulares se fijaron con glutaraldehído al 2% en buffer fosfato, (pH 7.2 hasta 7.4) durante 2 h a 4 °C. Las células se liberaron de su adhesión al sustrato de manera mecánica y luego se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Los pellets celulares se re-fijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C, se deshidrataron con etanol y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (90 nm) fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión - JEM 1200 EX II (JEOL).

## **12) Análisis estadístico**

Para cada grupo experimental se realizaron al menos tres replicados. Los datos fueron analizados utilizando Sigma Plot 12.5 (Systat Software, San José, CA) o Prism 6.0a (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). En todos los casos los resultados se presentan como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). El análisis de las diferencias entre las medias se realizó mediante t-test y análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. El nivel de alfa se estipuló a  $p < 0.05$ .

## PARTE IV - DISCUSION GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante el envejecimiento el estado homeostático del músculo esquelético se altera y comienza la pérdida de masa y fuerza muscular que genera además consecuencias sistémicas. Diversos estudios de cohortes demostraron que la pérdida de fuerza muscular asociada a la edad es 2 a 5 veces más rápida que la pérdida de masa muscular (**Goodpaster et al., 2006**) y que este fenómeno se correlaciona fuertemente con el riesgo de discapacidad y muerte (**Newman et al., 2006**). Así, aunque la masa de un músculo dado es un determinante importante de la fuerza que este puede desarrollar durante la contracción, queda demostrado que su disminución no permite explicar completamente la caída de la fuerza muscular conforme el individuo envejece (**Lynch et al., 1999; Rolland et al., 2007**). Deben existir entonces otros factores locales y/o sistémicos con un rol activo en el desarrollo de la sarcopenia.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que el envejecimiento afecta negativamente la eficiencia del proceso de activación-contracción (**Delbono, 2011**) principalmente por reducción de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio voltaje-dependiente, Cav1.1 (**Renganathan, Messi, & Delbono, 1997**). También reportamos un rol no tradicional para la isoforma de Troponina T expresada en músculos de contracción rápida, la TnT3. Específicamente, se determinó que esta proteína sufre una fragmentación controlada y que el fragmento carboxilo terminal (TnT-CT) se trasloca al núcleo celular generando una marcada disfunción nuclear y niveles reducidos de Cav1.1 (**Tan Zhang, Birbrair, & Delbono, 2013; Tan Zhang, Birbrair, Wang, et al., 2013**). Por otra parte, contábamos con evidencia que sugería que la fragmentación que experimenta la TnT3, y que se acentúa a medida que el individuo envejece, estaría mediada por calpaínas.

Sin embargo, la relación causal entre la fragmentación de TnT3 y la expresión de Cav1.1 en el músculo esquelético sarcopénico no había sido estudiada hasta ahora.

Al respecto, los resultados presentados aquí demuestran que (1) la inhibición del sistema proteolítico de calpaínas en el músculo esquelético de ratones C56BL/6 gerontes se asocia a un aumento en la fuerza de contracción que no responde al agregado de nuevas miofibras, ni de nuevos sarcómeros ni a un viraje hacia un predominio de fibras rápidas; (2) que dicho incremento en la eficiencia contráctil se asocia con una disminución en la

fragmentación de TnT3, con consiguiente reducción de la presencia del fragmento deletéreo C-terminal y con aumento de la expresión del canal de calcio del sarcolema, Cav1.1 que podría corresponder a una “liberación” de la represión ejercida sobre el promotor de Cacna1s por niveles normalmente elevados de TnT-CT y (3) que la reducción en los niveles de PPP1R12B, proteína reguladora de la fosfatasa de miosina, observados luego de la administración de BDA-410 podría constituirse como un factor co-adyuvante en la mejora de la fuerza de contracción al aumentar la sensibilidad del aparato contráctil al Ca<sup>+2</sup> citosólico.

Sin embargo, dado que la regulación de la expresión de Cav $\alpha_1$  parece ser multifactorial, no podemos descartar la participación de otros mecanismos en los resultados aquí presentados (*para más detalles ver Discusión del Capítulo 1*).

Un fenómeno sorprendente que observamos hacia el final del período experimental fue la significativa pérdida de peso corporal en el grupo tratado con BDA-410 mientras que el grupo control presentó un ligero aumento respecto del peso pre-intervención. Dado que el estado nutricional general, el metabolismo energético del tejido muscular, el peso y la composición corporal en relación a la distribución masa, magra/masa, grasa son factores importantes que pueden influir en la eficiencia de la contracción muscular decidimos explorar dicho fenómeno y clarificar el mecanismo.

Nuestros hallazgos al respecto señalan que: (1) la administración de BDA-410 provoca una reducción significativa del peso corporal, a expensas del contenido de grasa corporal y sin modificar la masa magra, la ingesta calórica o la actividad física espontánea; (2) la inhibición del sistema de calpaínas en el músculo esquelético de ratones gerontes altera significativamente el perfil de expresión génica de dicho tejido por un mecanismo aún poco claro; (3) la sobre-expresión de los genes *Ppard*, *Angptl4*, *Adipoq*, *Cdh13*, *Acs13*, *Fabp4*, *Ifi2712A* y *Retnla* modula la interacción entre el músculo y el tejido adiposo generando un estado pro-lipolítico y anti-adipogénico, con aumento en la liberación, captación y oxidación de AGNEs que podría ser responsable entonces de la pérdida de peso y contenido grasa corporal experimentada por estos individuos; (4) la inhibición del sistema de calpaínas se asocia a un aumento en los niveles de expresión del gen del IGF-1, fenómeno que podría contribuir al aumento de Cav1.1 en el músculo sarcopénico.

Otro determinante principal de la fuerza de contracción es el manejo eficiente del calcio intracelular, desde su paso facilitado por la membrana plasmática, hasta las proteínas citosólicas que regulan su disponibilidad. Aquí el canal Cav1.1 juega un rol fundamental permitiendo el ingreso de las primeras moléculas de dicho catión luego de la despolarización del sarcolema. Una vez en el citoplasma, el Ca<sup>+2</sup> puede comportarse como un segundo mensajero para múltiples vías de señalización. Recientemente se ha reportado como la permeabilidad de Cav1.1 al Ca<sup>+2</sup> puede modular el metabolismo lipídico de la fibra muscular mediante un rol no tradicional. Al parecer la activación mediada por Ca<sup>+2</sup> de CaMKII provoca la fosforilación y activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) que mediante la producción de óxido nítrico (NO) redistribuye hacia el sarcolema al transportador de ácidos grasos libres (AGNEs), CD36. El consiguiente aumento en la incorporación de AGNEs estimula la vía de oxidación de los mismos que incluye enzimas como ACS, CPT-1, etc. Este fenómeno parecería auto-regularse mediante un *feedback* o retroalimentación positiva mediada por CaMKII sobre Cav1.1 que al fosforilarlo potencia su actividad de canal de calcio (Georgiou et al., 2015).

Creemos que este reporte en la literatura presenta claras evidencias de una interfaz “acoplamiento excito-contráctil – metabolismo energético” en el músculo esquelético mediada en este caso por la actividad regulatoria de Cav1.1 sobre la oxidación de AGNEs y que puede a su vez tener un efecto beneficioso sobre la eficiencia de la generación de fuerza contráctil. Debemos recordar aquí que en nuestro modelo experimental, luego de la administración de BDA-410, se demostró la sobre-expresión a nivel proteico de Cav1.1 y a nivel génico de *Camk2d*, *Acsl3*, *Ppard*, *Fabp4*, *Adipoq* y *Angptl4*, entre otros, cuyos productos están directamente involucrados en la generación, captación y oxidación de ácidos grasos no esterificados. Aunque los resultados presentados aquí no son suficientes para confirmarlo, hipotetizamos que un fenómeno similar al descrito por Georgiou y cols. podría estar teniendo lugar en los músculos de los ratones gerontes tratados con el inhibidor de calpaínas y que podría entonces contribuir a la mejora observada en la fuerza específica de contracción.

Resta aún disecar con minuciosidad las vías y mecanismos por los cuales la inhibición del sistema de calpaínas en el músculo esquelético provoca los cambios metabólicos aquí descritos, una suerte de búsqueda del eslabón perdido. Dado que la administración del inhibidor BDA-410 fue sistémica resultará fundamental el análisis



transcriptómico y proteómico de tejidos como grasa, hígado, páncreas, etc. O bien, contar con un modelo de inhibición del sistema de calpaínas exclusivo del músculo esquelético que permita eliminar efectos de índole sistémica.

Por otro lado, el desarrollo de tecnologías que permitan el abordaje al interior de las células del músculo esquelético (ME), especialmente a las miofibras maduras, resulta vital para elucidar los mecanismos fisiopatológicos y desarrollar intervenciones terapéuticas para afecciones como las distrofias musculares hereditarias (Duchenne, Becker, miotónica, etc.), la sarcopenia, las heridas traumáticas, etc. Una de las áreas nanotecnológicas de mayor evolución se basa en el uso de nanopartículas con propiedades magnéticas (NPMs) para mejorar la transferencia de diversas moléculas, biológicas o sintéticas, terapéuticas o diagnósticas, a células y tejidos. La magnetofección es una técnica desarrollada hace poco más de 10 años en la cual se combinan vectores de transferencia génica virales o no-virales con NPMs y, bajo la influencia de un campo magnético externo, se fuerza su sedimentación sobre la superficie celular.

Hemos presentado aquí resultados que la magnetofección podría constituirse como una herramienta poderosa para asistir a la distribución génica mediada por vectores adenovirales recombinantes en miofibras maduras que normalmente son resistentes a la infección por parte de este tipo de virus. Así mismo, dado que el músculo esquelético es sitio frecuente de elección para la administración de sustancias como factores tróficos y agentes inmunomoduladores (vacunas) es válido considerar que este proyecto podría contribuir al desarrollo ulterior de métodos que asistan en la entrega de estas sustancias.

Sin embargo, es necesario sortear aún dificultades técnicas, previo a considerar a la magnetofección como una entidad viable para aplicaciones en medicina humana o veterinaria. El éxito de la magnetofección *in vivo* reside esencialmente en encontrar aquellas condiciones donde las propiedades mecánico-biológicas del tejido, la cantidad de NPMs administradas y la magnitud del campo magnético aplicado se conjuguen de manera tal de maximizar el tiempo de tránsito de los magnetovectores por las regiones donde se desea enfatizar la transferencia génica (magnetoforesis).

Para ello hemos propuesto como continuación del proyecto cuyos resultados se presentaron en esta tesis, desarrollar un modelo artificial (fantoma) de musculo esquelético basado en hidrogeles de polivinilalcohol (PVA) que remede las características mecánico-elásticas este tejido. Sobre ellos se estudiarán las condiciones que influyen en la magnetoforesis de magneto-vectores virales y células magnetizadas. Contamos para ello con un invaluable grupo multidisciplinario conformado principalmente por los Dres. Francisco Sánchez, Gustavo Pasquevich, Pedro Mendoza Zélis y Marcela Fernández van Raap (magnetismo y materiales magnéticos, IFLP, UNLP-CONICET) y las Dras. Jimena González, Vera Álvarez y Cristina Hoppe (hidrogeles y fantasmas de matriz polimérica y polímeros nanoestructurados, INTEMA, UNMDP-CONICET).

Vislumbramos que este proyecto de investigación brindara vital información para optimizar la transferencia génica mediada por adenovectores en tejidos animales, no agotando su aplicabilidad en los modelos biológicos que aquí se proponen.

## PARTE V – CONCLUSIONES

En función de los resultados que se describen en la presente tesis podemos concluir que:

(1) la inhibición del sistema proteolítico de calpaínas en el músculo esquelético de ratones C56BL/6 gerontes se asocia a un aumento en la fuerza de contracción sin modificación alguna de la masa muscular ni de la composición de miofibras;

(2) que dicho incremento en la eficiencia contráctil se asocia con una disminución en la fragmentación de TnT3, con consiguiente reducción de la presencia del fragmento deletéreo C-terminal y con aumento de la expresión del canal de calcio del sarcolema, Cav1.1;

(3) que la reducción en los niveles de PPP1R12B, subunidad reguladora de la fosfatasa de miosina, observados luego de la administración de BDA-410 podría constituirse como un factor co-adyuvante en la mejora de la fuerza de contracción al aumentar la sensibilidad del aparato contráctil al  $Ca^{+2}$  citosólico;

(4) que la administración de BDA-410 provoca una reducción significativa del peso corporal, a expensas del contenido de grasa corporal y sin modificar la masa magra, la ingesta calórica o la actividad física espontánea;

(5) que la administración de BDA-410 y consiguiente inhibición del sistema de calpaínas en el músculo esquelético de ratones gerontes altera significativamente el perfil de expresión génica de dicho tejido por un mecanismo aún poco claro;

(6) que la sobre-expresión de los genes *Ppard*, *Angptl4*, *Adipoq*, *Cdh13*, *Acs13*, *Fabp4*, *Ifi2712A* y *Retnla* modula la interacción entre el músculo y el tejido adiposo generando un estado pro-lipolítico y anti-adipogénico, con un posible aumento en la liberación, captación y oxidación de AGNEs que podría ser responsable entonces de la pérdida de peso y contenido graso corporal experimentada por estos individuos;

(7) que la inhibición del sistema de calpaínas se asocia a un aumento en los niveles de expresión del gen del IGF-1, fenómeno que podría contribuir al aumento observado de Cav1.1 en el músculo sarcopénico;

(8) que la transducción *in vitro* de miotúbulos maduros de la línea celular C2C12 utilizando solo vectores adenovirales (RAd) alcanza una expresión significativamente menor a la obtenida en mioblastos transducidos en las mismas condiciones;

(9) que la conjugación de vectores adenovirales recombinantes (RAd) con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (NPMs) para formar magneto-adenovectores puede superar la baja tasa de infección por parte de los miotúbulos y aumentar significativamente la sobreexpresión génica mediada por un adenovirus recombinante en células musculares esqueléticas maduras;

(10) que el campo magnético externo es un componente importante de la magnetofección ya que la exposición al mismo aumenta significativamente la transducción de las células musculares C2C12, probablemente por aumento en la magnitud de la sedimentación y acortamiento de los tiempos requeridos para la interacción con la membrana plasmática;

(11) la administración de magneto-adenovectores seguida por la exposición a un campo magnético externo, mejora la transducción *in vivo* del músculo Sóleo en ratones adultos C57BL/6.

## PARTE VI - BIBLIOGRAFIA

- Abele, K., & Yang, J. (2012). Regulation of voltage-gated calcium channels by proteolysis. *Sheng Li Xue Bao*, 64(5), 504-514. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090491>
- Acsadi, G., Jani, A., Massie, B., Simoneau, M., Holland, P., Blaschuk, K., & Karpati, G. (1994). A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Genet*, 3(4), 579-584. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069302>
- Aguer, C., Fiehn, O., Seifert, E. L., Bezaire, V., Meissen, J. K., Daniels, A., . . . Harper, M. E. (2013). Muscle uncoupling protein 3 overexpression mimics endurance training and reduces circulating biomarkers of incomplete beta-oxidation. *FASEB J*, 27(10), 4213-4225. doi:10.1096/fj.13-234302
- Aitken, A., & Learmonth, M. (2002). Protein identification by in-gel digestion and mass spectrometric analysis. *Mol Biotechnol*, 20(1), 95-97. doi:10.1385/MB:20:1:095
- Akinc, A., & Battaglia, G. (2013). Exploiting endocytosis for nanomedicines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(11), a016980. doi:10.1101/cshperspect.a016980
- Akiyama, H., Ito, A., Kawabe, Y., & Kamihira, M. (2010). Genetically engineered angiogenic cell sheets using magnetic force-based gene delivery and tissue fabrication techniques. *Biomaterials*, 31(6), 1251-1259. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.017
- Alley, D. E., Koster, A., Mackey, D., Cawthon, P., Ferrucci, L., Simonsick, E. M., . . . Harris, T. (2010). Hospitalization and change in body composition and strength in a population-based cohort of older persons. *J Am Geriatr Soc*, 58(11), 2085-2091. doi:10.1111/j.1532-5415.2010.03144.x
- Almstatter, I., Mykhaylyk, O., Settles, M., Altomonte, J., Aichler, M., Walch, A., . . . Braren, R. (2015). Characterization of magnetic viral complexes for targeted delivery in oncology. *Theranostics*, 5(7), 667-685. doi:10.7150/thno.10438
- Ando, R., Sakaki, T., Morinaka, Y., Takahashi, C., Tamao, Y., Yoshii, N., . . . Nakamura, E. (1999). Cyclopropanone-containing cysteine proteinase inhibitors. Synthesis and enzyme inhibitory activities. *Bioorg Med Chem*, 7(4), 571-579. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353636>
- Anker, S. D., Ponikowski, P., Varney, S., Chua, T. P., Clark, A. L., Webb-Peploe, K. M., . . . Coats, A. J. (1997). Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet*, 349(9058), 1050-1053. doi:10.1016/S0140-6736(96)07015-8
- Asumda, F. Z., & Chase, P. B. (2012). Nuclear cardiac troponin and tropomyosin are expressed early in cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 83(3), 106-115. doi:10.1016/j.diff.2011.10.002
- Bakhr, S. H., Altiok, E., Highley, C., Delubac, D., Suhan, J., Hitchens, T. K., . . . Zappe, S. (2012). Enhanced cellular uptake and long-term retention of chitosan-modified iron-oxide nanoparticles for MRI-based cell tracking. *Int J Nanomedicine*, 7, 4613-4623. doi:10.2147/IJN.S28294
- Bannister, R. A. (2007). Bridging the myoplasmic gap: recent developments in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *J Muscle Res Cell Motil*, 28(4-5), 275-283. doi:10.1007/s10974-007-9118-5
- Baudry, M., & Bi, X. (2013). Learning and memory: an emergent property of cell motility. *Neurobiol Learn Mem*, 104, 64-72. doi:10.1016/j.nlm.2013.04.012
- Baumann, A. P., Ibebunjo, C., Grasser, W. A., & Paralkar, V. M. (2003). Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 3(1), 8-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758361>

- Behr, J.-P. (1997). The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 51(1-2), 34-36. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/scs/chimia/1997/00000051/F0020001/art00026>
- Belakavadi, M., & Fondell, J. D. (2006). Role of the mediator complex in nuclear hormone receptor signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 156, 23-43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16634145>
- Bett, A. J., Haddara, W., Prevec, L., & Graham, F. L. (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19), 8802-8806. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8090727>
- Billiet, L., Gomez, J. P., Berchel, M., Jaffres, P. A., Le Gall, T., Montier, T., . . . Midoux, P. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials*, 33(10), 2980-2990. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.027
- Blagoev, B., Kratchmarova, I., Nielsen, M. M., Fernandez, M. M., Voldby, J., Andersen, J. S., . . . Mann, M. (2002). Inhibition of adipocyte differentiation by resistin-like molecule alpha. Biochemical characterization of its oligomeric nature. *J Biol Chem*, 277(44), 42011-42016. doi:10.1074/jbc.M206975200
- Bortoluzzi, S., Scannapieco, P., Cestaro, A., Danieli, G. A., & Schiaffino, S. (2006). Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome. *Proteins*, 62(3), 776-792. doi:10.1002/prot.20803
- Bregar, V. B., Lojk, J., Sustar, V., Veranic, P., & Pavlin, M. (2013). Visualization of internalization of functionalized cobalt ferrite nanoparticles and their intracellular fate. *Int J Nanomedicine*, 8, 919-931. doi:10.2147/IJN.S38749
- Breier, B. H., Gallaher, B. W., & Gluckman, P. D. (1991). Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol*, 128(3), 347-357. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1707433>
- Breuer, K., Froushani, A. K., Laird, M. R., Chen, C., Sribnaia, A., Lo, R., . . . Lynn, D. J. (2013). InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond--recent updates and continuing curation. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D1228-1233. doi:10.1093/nar/gks1147
- Brooks, S. P., & Dunnett, S. B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*, 10(7), 519-529. doi:10.1038/nrn2652
- Brooks, S. V., & Faulkner, J. A. (1988). Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J Physiol*, 404, 71-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3253447>
- Buraei, Z., & Yang, J. (2013). Structure and function of the beta subunit of voltage-gated Ca(2)(+) channels. *Biochim Biophys Acta*, 1828(7), 1530-1540. doi:10.1016/j.bbamem.2012.08.028
- Busiello, R. A., Savarese, S., & Lombardi, A. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol*, 6, 36. doi:10.3389/fphys.2015.00036
- Campbell, M. J., McComas, A. J., & Petito, F. (1973). Physiological changes in ageing muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 36(2), 174-182. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4708452>
- Campbell, R. L., & Davies, P. L. (2012). Structure-function relationships in calpains. *Biochem J*, 447(3), 335-351. doi:10.1042/BJ20120921
- Cao, A., Li, H., Zhou, Y., Wu, M., & Liu, J. (2010). Long chain acyl-CoA synthetase-3 is a molecular target for peroxisome proliferator-activated receptor delta in HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem*, 285(22), 16664-16674. doi:10.1074/jbc.M110.112805
- Cao, B., Pruchnic, R., Ikezawa, M., Xiao, X., Li, J., Wickham, T. J., . . . Huard, J. (2001). The role of receptors in the maturation-dependent adenoviral transduction of myofibers. *Gene Ther*, 8(8), 627-637. doi:10.1038/sj.gt.3301425

- Carragher, N. O. (2006). Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr Pharm Des*, 12(5), 615-638. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16472152](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16472152)
- Catoire, M., Alex, S., Paraskevopoulos, N., Mattijssen, F., Evers-van Gogh, I., Schaart, G., . . . Kersten, S. (2014). Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(11), E1043-1052. doi:10.1073/pnas.1400889111
- Chang, K. L., Higuchi, Y., Kawakami, S., Yamashita, F., & Hashida, M. (2010). Efficient gene transfection by histidine-modified chitosan through enhancement of endosomal escape. *Bioconj Chem*, 21(6), 1087-1095. doi:10.1021/bc1000609
- Choi, J. W., Park, J. W., Na, Y., Jung, S. J., Hwang, J. K., Choi, D., . . . Yun, C. O. (2015). Using a magnetic field to redirect an oncolytic adenovirus complexed with iron oxide augments gene therapy efficacy. *Biomaterials*, 65, 163-174. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.07.001
- Chorny, M., Polyak, B., Alferiev, I. S., Walsh, K., Friedman, G., & Levy, R. J. (2007). Magnetically driven plasmid DNA delivery with biodegradable polymeric nanoparticles. *FASEB J*, 21(10), 2510-2519. doi:10.1096/fj.06-8070com
- Clapham, J. C., Arch, J. R., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G. B., . . . Abuin, A. (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*, 406(6794), 415-418. doi:10.1038/35019082
- Coe, N. R., Simpson, M. A., & Bernlohr, D. A. (1999). Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res*, 40(5), 967-972. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224167>
- Cruz-Jentoft, A. J., Landi, F., Schneider, S. M., Zuniga, C., Arai, H., Boirie, Y., . . . Cederholm, T. (2014). Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age Ageing*, 43(6), 748-759. doi:10.1093/ageing/afu115
- Daughaday, W. H., & Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*, 10(1), 68-91. doi:10.1210/edrv-10-1-68
- De Franceschi, L., Franco, R. S., Bertoldi, M., Brugnara, C., Matte, A., Siciliano, A., . . . Joiner, C. H. (2013). Pharmacological inhibition of calpain-1 prevents red cell dehydration and reduces Gardos channel activity in a mouse model of sickle cell disease. *FASEB J*, 27(2), 750-759. doi:10.1096/fj.12-217836
- De Jongh, K. S., Warner, C., Colvin, A. A., & Catterall, W. A. (1991). Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23), 10778-10782. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720551>
- Delaigle, A. M., Senou, M., Guiot, Y., Many, M. C., & Brichard, S. M. (2006). Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: In vivo and in vitro studies. *Diabetologia*, 49(6), 1311-1323. doi:10.1007/s00125-006-0210-y
- Delbono, O. (2011). Excitation-Contraction Coupling Regulation in Aging Skeletal Muscle. In G. S. Lynch (Ed.), *Sarcopenia-Age-Related Muscle Wasting and Weakness. Mechanisms and Treatment* (pp. 113-134). Victoria: Springer.
- Delbono, O., & Chu, A. (1995). Ca<sup>2+</sup> release channels in rat denervated skeletal muscles. *Exp Physiol*, 80(4), 561-574. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576596>
- Demontis, F., & Perrimon, N. (2010). FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell*, 143(5), 813-825. doi:10.1016/j.cell.2010.10.007
- Demontis, F., Piccirillo, R., Goldberg, A. L., & Perrimon, N. (2013). The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan. *Aging Cell*, 12(6), 943-949. doi:10.1111/accel.12126

- Denzel, M. S., Scimia, M. C., Zumstein, P. M., Walsh, K., Ruiz-Lozano, P., & Ranscht, B. (2010). T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest*, *120*(12), 4342-4352. doi:10.1172/JCI43464
- Dippold, R. P., & Fisher, S. A. (2014). A bioinformatic and computational study of myosin phosphatase subunit diversity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *307*(3), R256-270. doi:10.1152/ajpregu.00145.2014
- Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda)*, *26*(3), 192-205. doi:10.1152/physiol.00046.2010
- Dressel, U., Allen, T. L., Pippal, J. B., Rohde, P. R., Lau, P., & Muscat, G. E. (2003). The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol*, *17*(12), 2477-2493. doi:10.1210/me.2003-0151
- El-Sayed, A., & Harashima, H. (2013). Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol Ther*, *21*(6), 1118-1130. doi:10.1038/mt.2013.54
- Faulkner, J. A., Brooks, S. V., & Opitck, J. A. (1993). Injury to Skeletal Muscle Fibers During Contractions: Conditions of Occurrence and Prevention. *Physical Therapy*, *73*(12), 911-921. Retrieved from <http://ptjournal.apta.org/content/73/12/911.abstract>
- Feng, H. Z., Hossain, M. M., Huang, X. P., & Jin, J. P. (2009). Myofilament incorporation determines the stoichiometry of troponin I in transgenic expression and the rescue of a null mutation. *Arch Biochem Biophys*, *487*(1), 36-41. doi:10.1016/j.abb.2009.05.001
- Fiaschi, T., Giannoni, E., Taddei, M. L., & Chiarugi, P. (2012). Globular adiponectin activates motility and regenerative traits of muscle satellite cells. *PLoS One*, *7*(5), e34782. doi:10.1371/journal.pone.0034782
- Fielding, R. A., Vellas, B., Evans, W. J., Bhasin, S., Morley, J. E., Newman, A. B., . . . Zamboni, M. (2011). Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc*, *12*(4), 249-256. doi:10.1016/j.jamda.2011.01.003
- Flurkey, K., Curren, J.M., Harrison, D.E. (2007). The Mouse in Aging Research. In J. G. Fox (Ed.), *In The Mouse in Biomedical Research* (2nd ed., pp. 637–672). Burlington, MA: American College Laboratory Animal Medicine (Elsevier).
- Fraker, P. J., & Speck, J. C., Jr. (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun*, *80*(4), 849-857. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/637870>
- Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., . . . Lodish, H. F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(4), 2005-2010. doi:10.1073/pnas.041591798
- Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., & Miura, T. (2014). Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol*, *8*(Suppl 3), 23-33. doi:10.4137/CMC.S17067
- Gao, T., Bunemann, M., Gerhardstein, B. L., Ma, H., & Hosey, M. M. (2000). Role of the C terminus of the alpha 1C (CaV1.2) subunit in membrane targeting of cardiac L-type calcium channels. *J Biol Chem*, *275*(33), 25436-25444. doi:10.1074/jbc.M003465200
- Gao, X., & Huang, L. (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*, *2*(10), 710-722. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8750010>
- Georgiou, D. K., Dagnino-Acosta, A., Lee, C. S., Griffin, D. M., Wang, H., Lagor, W. R., . . . Hamilton, S. L. (2015). Ca<sup>2+</sup> Binding/Permeation via Calcium Channel, CaV1.1, Regulates the Intracellular Distribution of the Fatty Acid Transport Protein, CD36, and Fatty Acid Metabolism. *J Biol Chem*, *290*(39), 23751-23765. doi:10.1074/jbc.M115.643544
- Goldspink, G. (2003). Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, *17*(2), 211-222. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787548>



- Goldspink, G. (2012). Age-related loss of muscle mass and strength. *J Aging Res*, 2012, 158279. doi:10.1155/2012/158279
- Goldspink, G., & Harridge, S. D. (2004). Growth factors and muscle ageing. *Exp Gerontol*, 39(10), 1433-1438. doi:10.1016/j.exger.2004.08.010
- Gonzalez-Gutierrez, G., Miranda-Laferte, E., Neely, A., & Hidalgo, P. (2007). The Src homology 3 domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *J Biol Chem*, 282(4), 2156-2162. doi:10.1074/jbc.M609071200
- Gonzalez, E., Messi, M. L., Zheng, Z., & Delbono, O. (2003). Insulin-like growth factor-1 prevents age-related decrease in specific force and intracellular Ca<sup>2+</sup> in single intact muscle fibres from transgenic mice. *J Physiol*, 552(Pt 3), 833-844. doi:10.1113/jphysiol.2003.048165
- Goodpaster, B. H., Park, S. W., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., Nevitt, M., Schwartz, A. V., . . . Newman, A. B. (2006). The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61(10), 1059-1064. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077199>
- Gordon, A. M., Homsher, E., & Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*, 80(2), 853-924. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10747208](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10747208)
- Graber, T. G., Ferguson-Stegall, L., Kim, J. H., & Thompson, L. V. (2013). C57BL/6 neuromuscular healthspan scoring system. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68(11), 1326-1336. doi:10.1093/gerona/glt032
- Grassie, M. E., Moffat, L. D., Walsh, M. P., & MacDonald, J. A. (2011). The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1delta. *Arch Biochem Biophys*, 510(2), 147-159. doi:10.1016/j.abb.2011.01.018
- Gray, P. C., Tibbs, V. C., Catterall, W. A., & Murphy, B. J. (1997). Identification of a 15-kDa cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein associated with skeletal muscle L-type calcium channels. *J Biol Chem*, 272(10), 6297-6302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9045648>
- Gu, J., Xu, H., Han, Y., Dai, W., Hao, W., Wang, C., . . . Cao, J. (2011). The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. *Sci China Life Sci*, 54(9), 793-805. doi:10.1007/s11427-011-4215-5
- Gujrati, M., Malamas, A., Shin, T., Jin, E., Sun, Y., & Lu, Z. R. (2014). Multifunctional cationic lipid-based nanoparticles facilitate endosomal escape and reduction-triggered cytosolic siRNA release. *Mol Pharm*, 11(8), 2734-2744. doi:10.1021/mp400787s
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.012
- Hashimoto, M., & Hisano, Y. (2011). Directional gene-transfer into the brain by an adenoviral vector tagged with magnetic nanoparticles. *J Neurosci Methods*, 194(2), 316-320. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.10.027
- Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Breeze, L. J., Wang, K. K., Chavkin, C., & Catterall, W. A. (1996). N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8), 3362-3367. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622942>
- Hillaireau, H., & Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*, 66(17), 2873-2896. doi:10.1007/s00018-009-0053-z
- Holst, D., Luquet, S., Kristiansen, K., & Grimaldi, P. A. (2003). Roles of peroxisome proliferator-activated receptors delta and gamma in myoblast transdifferentiation. *Exp Cell Res*, 288(1), 168-176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878168>

- Huard, J., Lochmuller, H., Acsadi, G., Jani, A., Holland, P., Guerin, C., . . . Karpati, G. (1995). Differential short-term transduction efficiency of adult versus newborn mouse tissues by adenoviral recombinants. *Exp Mol Pathol*, *62*(2), 131-143. doi:10.1006/exmp.1995.1015
- Hug, C., Wang, J., Ahmad, N. S., Bogan, J. S., Tsao, T. S., & Lodish, H. F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(28), 10308-10313. doi:10.1073/pnas.0403382101
- Hulme, J. T., Ahn, M., Hauschka, S. D., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2002). A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C terminus of the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> channel and modulates its function. *J Biol Chem*, *277*(6), 4079-4087. doi:10.1074/jbc.M109814200
- Hulme, J. T., Konoki, K., Lin, T. W., Gritsenko, M. A., Camp, D. G., 2nd, Bigelow, D. J., & Catterall, W. A. (2005). Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(14), 5274-5279. doi:10.1073/pnas.0409885102
- Hulme, J. T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T. W., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2006). Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol*, *576*(Pt 1), 87-102. doi:10.1113/jphysiol.2006.111799
- Huth, S., Lausier, J., Gersting, S. W., Rudolph, C., Plank, C., Welsch, U., & Rosenecker, J. (2004). Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med*, *6*(8), 923-936. doi:10.1002/jgm.577
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B., & Speed, T. P. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, *31*(4), e15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582260>
- Iso, T., Maeda, K., Hanaoka, H., Suga, T., Goto, K., Syamsunarno, M. R., . . . Kurabayashi, M. (2013). Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *33*(11), 2549-2557. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301588
- Jackman, R. W., & Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, *287*(4), C834-843. doi:10.1152/ajpcell.00579.2003
- Jin, J. P., & Chong, S. M. (2010). Localization of the two tropomyosin-binding sites of troponin T. *Arch Biochem Biophys*, *500*(2), 144-150. doi:10.1016/j.abb.2010.06.001
- Jin, J. P., Yang, F. W., Yu, Z. B., Ruse, C. I., Bond, M., & Chen, A. (2001). The highly conserved COOH terminus of troponin I forms a Ca<sup>2+</sup>-modulated allosteric domain in the troponin complex. *Biochemistry*, *40*(8), 2623-2631. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327886>
- Jin, J. P., Zhang, Z., & Bautista, J. A. (2008). Isoform diversity, regulation, and functional adaptation of troponin and calponin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, *18*(2), 93-124. doi:208622c07c293e64,549483ee6d8a58cd [pii]
- Kersten, S., Lichtenstein, L., Steenbergen, E., Mudde, K., Hendriks, H. F., Hesselink, M. K., . . . Muller, M. (2009). Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(6), 969-974. doi:10.1161/ATVBAHA.108.182147
- Kimura, E., Maeda, Y., Arima, T., Nishida, Y., Yamashita, S., Hara, A., . . . Uchino, M. (2001). Efficient repetitive gene delivery to skeletal muscle using recombinant adenovirus vector containing the Coxsackievirus and adenovirus receptor cDNA. *Gene Ther*, *8*(1), 20-27. doi:10.1038/sj.gt.3301359
- Kloeckner, J., Boeckle, S., Persson, D., Roedl, W., Ogris, M., Berg, K., & Wagner, E. (2006). DNA polyplexes based on degradable oligoethylenimine-derivatives: combination with EGF receptor targeting and endosomal release functions. *J Control Release*, *116*(2), 115-122. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.002

- Knudson, C. M., Chaudhari, N., Sharp, A. H., Powell, J. A., Beam, K. G., & Campbell, K. P. (1989). Specific absence of the alpha 1 subunit of the dihydropyridine receptor in mice with muscular dysgenesis. *J Biol Chem*, *264*(3), 1345-1348. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2536362>
- Lane, L. A., Qian, X., Smith, A. M., & Nie, S. (2015). Physical chemistry of nanomedicine: understanding the complex behaviors of nanoparticles in vivo. *Annu Rev Phys Chem*, *66*, 521-547. doi:10.1146/annurev-physchem-040513-103718
- Larsson, L., Li, X., & Frontera, W. R. (1997). Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *Am J Physiol*, *272*(2 Pt 1), C638-649. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9124308>
- Lee, M. R., Lim, C. J., Lee, Y. H., Park, J. G., Sonn, S. K., Lee, M. N., . . . Oh, G. T. (2014). The adipokine Retnla modulates cholesterol homeostasis in hyperlipidemic mice. *Nat Commun*, *5*, 4410. doi:10.1038/ncomms5410
- Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., & Tsai, L. H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, *405*(6784), 360-364. doi:10.1038/35012636
- Lee, P. D., Baker, B. K., Liu, F., Kwan, E. Y., & Hintz, R. L. (1996). A homologous radioimmunoassay for rat insulin-like growth factor-I (IGF-I): implications for studies of human IGF-I physiology. *J Clin Endocrinol Metab*, *81*(5), 2002-2005. doi:10.1210/jcem.81.5.8626873
- Lemieux, P., Guerin, N., Paradis, G., Proulx, R., Chistyakova, L., Kabanov, A., & Alakhov, V. (2000). A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*, *7*(11), 986-991. doi:10.1038/sj.gt.3301189
- Leung, A. T., Imagawa, T., & Campbell, K. P. (1987). Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem*, *262*(17), 7943-7946. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2439496>
- Li, B., Shin, J., & Lee, K. (2009). Interferon-stimulated gene ISG12b1 inhibits adipogenic differentiation and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 cells. *Endocrinology*, *150*(3), 1217-1224. doi:10.1210/en.2008-0727
- Li, X., Chen, H., Jeong, J. J., & Chishti, A. H. (2007). BDA-410: a novel synthetic calpain inhibitor active against blood stage malaria. *Mol Biochem Parasitol*, *155*(1), 26-32. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.05.004
- Liu, L., Shi, X., Choi, C. S., Shulman, G. I., Klaus, K., Nair, K. S., . . . Yu, Y. H. (2009). Paradoxical coupling of triglyceride synthesis and fatty acid oxidation in skeletal muscle overexpressing DGAT1. *Diabetes*, *58*(11), 2516-2524. doi:10.2337/db08-1096
- Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M., & Grimaldi, P. A. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J*, *17*(15), 2299-2301. doi:10.1096/fj.03-0269fje
- Lynch, G. S., Hinkle, R. T., & Faulkner, J. A. (1999). Year-long clenbuterol treatment of mice increases mass, but not specific force or normalized power, of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *26*(2), 117-120. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10065331>
- Ma, Y., Zhang, Z., Wang, X., Xia, W., & Gu, H. (2011). Insights into the mechanism of magnetofection using MNPs-PEI/pDNA/free PEI magnetofectins. *Int J Pharm*, *419*(1-2), 247-254. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.017
- Maiolino, S., Russo, A., Pagliara, V., Conte, C., Ungaro, F., Russo, G., & Quaglia, F. (2015). Biodegradable nanoparticles sequentially decorated with Polyethyleneimine and Hyaluronan for the targeted delivery of docetaxel to airway cancer cells. *J Nanobiotechnology*, *13*, 29. doi:10.1186/s12951-015-0088-2
- Mandard, S., Zandbergen, F., van Straten, E., Wahli, W., Kuipers, F., Muller, M., & Kersten, S. (2006). The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem*, *281*(2), 934-944. doi:10.1074/jbc.M506519200

- Mattiuzzi, A. R. (2002). Músculo esquelético, cardíaco y liso *Fisiología Humana de Houssay* (7th ed., pp. 34). Buenos Aires, Argentina: El Ateneo.
- Mattijssen, F., Alex, S., Swarts, H. J., Groen, A. K., van Schothorst, E. M., & Kersten, S. (2014). Angptl4 serves as an endogenous inhibitor of intestinal lipid digestion. *Mol Metab*, 3(2), 135-144. doi:10.1016/j.molmet.2013.11.004
- McCully, K. K., & Faulkner, J. A. (1986). Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* (1985), 61(1), 293-299. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3733615>
- Meier, O., Boucke, K., Hammer, S. V., Keller, S., Stidwill, R. P., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol*, 158(6), 1119-1131. doi:10.1083/jcb.200112067
- Meier, O., & Greber, U. F. (2004). Adenovirus endocytosis. *J Gene Med*, 6 Suppl 1, S152-163. doi:10.1002/jgm.553
- Metter, E. J., Talbot, L. A., Schrager, M., & Conwit, R. (2002). Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 57(10), B359-365. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242311>
- Moore, G. B., Chapman, H., Holder, J. C., Lister, C. A., Piercy, V., Smith, S. A., & Clapham, J. C. (2001). Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(4), 735-741. doi:10.1006/bbrc.2001.5460
- Mortensen, O. H., Plomgaard, P., Fischer, C. P., Hansen, A. K., Pilegaard, H., & Pedersen, B. K. (2007). PGC-1beta is downregulated by training in human skeletal muscle: no effect of training twice every second day vs. once daily on expression of the PGC-1 family. *J Appl Physiol* (1985), 103(5), 1536-1542. doi:10.1152/jappphysiol.00575.2007
- Muoio, D. M., MacLean, P. S., Lang, D. B., Li, S., Houmard, J. A., Way, J. M., . . . Kraus, W. E. (2002). Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem*, 277(29), 26089-26097. doi:10.1074/jbc.M203997200
- Mykhaylyk, O., Antequera, Y. S., Vlaskou, D., & Plank, C. (2007). Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat Protoc*, 2(10), 2391-2411. doi:10.1038/nprot.2007.352
- Mykhaylyk, O., Zelphati, O., Hammerschmid, E., Anton, M., Rosenecker, J., & Plank, C. (2009). Recent advances in magnetofection and its potential to deliver siRNAs in vitro. *Methods Mol Biol*, 487, 111-146. doi:10.1007/978-1-60327-547-7\_6
- Mykhaylyk O., L. D., Vlaskou D., Schoemig V., Detloff T., Krause D., Wolff M., Joas T., Berensmeier S., Plank C. (2015). Magnetophoretic mobility: Determination by space and time resolved extinction profiles (in-situ visualization). *IEEE Magnetic Letters*, 6. doi:10.1109/LMAG.2009.2033258
- Nabeshima, Y., Washida, M., Tamura, M., Maeno, A., Ohnishi, M., Shiroishi, T., . . . Nabeshima, Y.-i. (2014). Calpain 1 inhibitor BDA-410 ameliorates alpha-klotho-deficiency phenotypes resembling human aging-related syndromes. *Sci. Rep.*, 4. doi:10.1038/srep05847
- <http://www.nature.com/srep/2014/140801/srep05847/abs/srep05847.html#supplementary-information>
- Nabeshima, Y., Washida, M., Tamura, M., Maeno, A., Ohnishi, M., Shiroishi, T., . . . Nabeshima, Y. (2014). Calpain 1 inhibitor BDA-410 ameliorates alpha-klotho-deficiency phenotypes resembling human aging-related syndromes. *Sci Rep*, 4, 5847. doi:10.1038/srep05847
- Nalbantoglu, J., Larochele, N., Wolf, E., Karpati, G., Lochmuller, H., & Holland, P. C. (2001). Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle. *J Virol*, 75(9), 4276-4282. doi:10.1128/JVI.75.9.4276-4282.2001

- Nalbantoglu, J., Pari, G., Karpati, G., & Holland, P. C. (1999). Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum Gene Ther*, *10*(6), 1009-1019. doi:10.1089/10430349950018409
- Newman, A. B., Kupelian, V., Visser, M., Simonsick, E. M., Goodpaster, B. H., Kritchevsky, S. B., . . . Harris, T. B. (2006). Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in the health, aging and body composition study cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *61*(1), 72-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456196>
- Oh, N., & Park, J. H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*, *9 Suppl 1*, 51-63. doi:10.2147/IJN.S26592
- Ordelheide, A. M., Heni, M., Gommer, N., Gasse, L., Haas, C., Guirguis, A., . . . Staiger, H. (2011). The myocyte expression of adiponectin receptors and PPARdelta is highly coordinated and reflects lipid metabolism of the human donors. *Exp Diabetes Res*, *2011*, 692536. doi:10.1155/2011/692536
- Pallafacchina, G., Blaauw, B., & Schiaffino, S. (2013). Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, *23 Suppl 1*, S12-18. doi:10.1016/j.numecd.2012.02.002
- Plank, C., Zelphati, O., & Mykhaylyk, O. (2011). Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. *Adv Drug Deliv Rev*, *63*(14-15), 1300-1331. doi:10.1016/j.addr.2011.08.002
- Poussard, S., Decossas, M., Le Bihan, O., Mornet, S., Naudin, G., & Lambert, O. (2015). Internalization and fate of silica nanoparticles in C2C12 skeletal muscle cells: evidence of a beneficial effect on myoblast fusion. *Int J Nanomedicine*, *10*, 1479-1492. doi:10.2147/IJN.S74158
- Powers, S. K., Duarte, J., Kavazis, A. N., & Talbert, E. E. (2010). Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*, *95*(1), 1-9. doi:10.1113/expphysiol.2009.050526
- Pratesi, A., Tarantini, F., & Di Bari, M. (2013). Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clin Cases Miner Bone Metab*, *10*(1), 11-14. doi:10.11138/ccmbm/2013.10.1.011
- Prijic, S., Scancar, J., Romih, R., Cemazar, M., Bregar, V. B., Znidarsic, A., & Sersa, G. (2010). Increased cellular uptake of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles into malignant cells by an external magnetic field. *J Membr Biol*, *236*(1), 167-179. doi:10.1007/s00232-010-9271-4
- Ranscht, B., & Dours-Zimmermann, M. T. (1991). T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron*, *7*(3), 391-402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654948>
- Raschke, S., & Eckel, J. (2013). Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise. *Mediators Inflamm*, *2013*, 320724. doi:10.1155/2013/320724
- Remaut, K., Oorschot, V., Braeckmans, K., Klumperman, J., & De Smedt, S. C. (2014). Lysosomal capturing of cytoplasmic injected nanoparticles by autophagy: an additional barrier to non viral gene delivery. *J Control Release*, *195*, 29-36. doi:10.1016/j.jconrel.2014.08.002
- Renganathan, M., Messi, M. L., & Delbono, O. (1997). Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor uncoupling in aged skeletal muscle. *Journal of Membrane Biology*, *157*(3), 247-253.
- Renganathan, M., Messi, M. L., & Delbono, O. (1998). Overexpression of IGF-1 exclusively in skeletal muscle prevents age-related decline in the number of dihydropyridine receptors. *J Biol Chem*, *273*(44), 28845-28851. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786885>
- Renganathan, M., Messi, M. L., Schwartz, R., & Delbono, O. (1997). Overexpression of hIGF-1 exclusively in skeletal muscle increases the number of dihydropyridine receptors in adult



- transgenic mice. *FEBS Lett*, 417(1), 13-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395065>
- Robciuc, M. R., Skrobuk, P., Anisimov, A., Olkkonen, V. M., Alitalo, K., Eckel, R. H., . . . Ehnholm, C. (2012). Angiopoietin-like 4 mediates PPAR delta effect on lipoprotein lipase-dependent fatty acid uptake but not on beta-oxidation in myotubes. *PLoS One*, 7(10), e46212. doi:10.1371/journal.pone.0046212
- Rolland, Y. M., Perry, H. M., 3rd, Patrick, P., Banks, W. A., & Morley, J. E. (2007). Loss of appendicular muscle mass and loss of muscle strength in young postmenopausal women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 62(3), 330-335. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389732>
- Ruiz, J. R., Sui, X., Lobelo, F., Morrow, J. R., Jr., Jackson, A. W., Sjoström, M., & Blair, S. N. (2008). Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. *BMJ*, 337, a439. doi:10.1136/bmj.a439
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., . . . Quackenbush, J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34(2), 374-378. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12613259>
- Sahota, V. K., Grau, B. F., Mansilla, A., & Ferrus, A. (2009). Troponin I and Tropomyosin regulate chromosomal stability and cell polarity. *J Cell Sci*, 122(Pt 15), 2623-2631. doi:10.1242/jcs.050880
- Salazar, J. J., Michele, D. E., & Brooks, S. V. (2010). *Inhibition of calpain prevents muscle weakness and disruption of sarcomere structure during hindlimb suspension* (Vol. 108).
- Sanchez-Antequera, Y., Mykhaylyk, O., Thalhammer, S., & Plank, C. (2010). Gene delivery to Jurkat T cells using non-viral vectors associated with magnetic nanoparticles. *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 1(Number 2-4/2010), 202-229.
- Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(10), 2121-2129. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.023
- Sandri, M., Bortoloso, E., Nori, A., & Volpe, P. (2003). Electrotransfer in differentiated myotubes: a novel, efficient procedure for functional gene transfer. *Experimental Cell Research*, 286(1), 87-95. doi:10.1016/s0014-4827(03)00097-1
- Sapet, C., Pellegrino, C., Laurent, N., Sicard, F., & Zelphati, O. (2012). Magnetic nanoparticles enhance adenovirus transduction in vitro and in vivo. *Pharm Res*, 29(5), 1203-1218. doi:10.1007/s11095-011-0629-9
- Sapru, M. K., McCormick, K. M., & Thimmapaya, B. (2002). High-efficiency adenovirus-mediated in vivo gene transfer into neonatal and adult rodent skeletal muscle. *J Neurosci Methods*, 114(1), 99-106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850044>
- Schachtrup, C., Emmler, T., Bleck, B., Sandqvist, A., & Spener, F. (2004). Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem J*, 382(Pt 1), 239-245. doi:10.1042/BJ20031340
- Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., . . . Plank, C. (2002). Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 9(2), 102-109. doi:10.1038/sj.gt.3301624
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91(4), 1447-1531. doi:10.1152/physrev.00031.2010
- Schneider, M. F., & Chandler, W. K. (1973). Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature*, 242(5395), 244-246. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4540479>
- Schroder, E., Byse, M., & Satin, J. (2009). L-type calcium channel C terminus autoregulates transcription. *Circ Res*, 104(12), 1373-1381. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.191387
- Sculptoreanu, A., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1993). Voltage-dependent potentiation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Nature*, 364(6434), 240-243. doi:10.1038/364240a0

- Seth, A., Steel, J. H., Nichol, D., Pocock, V., Kumaran, M. K., Fritah, A., . . . Parker, M. (2007). The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Metab*, 6(3), 236-245. doi:10.1016/j.cmet.2007.08.004
- Shimatsu, A., & Rotwein, P. (1987). Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. Organization, sequence, and expression of the rat insulin-like growth factor I gene. *J Biol Chem*, 262(16), 7894-7900. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3034909>
- Simoes, A. T., Goncalves, N., Nobre, R. J., Duarte, C. B., & Pereira de Almeida, L. (2014). Calpain inhibition reduces ataxin-3 cleavage alleviating neuropathology and motor impairments in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, 23(18), 4932-4944. doi:10.1093/hmg/ddu209
- Smith, I. J., Lecker, S. H., & Hasselgren, P. O. (2008). Calpain activity and muscle wasting in sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(4), E762-771. doi:10.1152/ajpendo.90226.2008
- Snel, B., Lehmann, G., Bork, P., & Huynen, M. A. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res*, 28(18), 3442-3444. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982861>
- Sorimachi, H., Hata, S., & Ono, Y. (2011). Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 87(6), 287-327. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670566>
- Sorimachi, H., & Ono, Y. (2012). Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc Res*, 96(1), 11-22. doi:10.1093/cvr/cvs157
- Soto-Sanchez, C., Martinez-Navarrete, G., Humphreys, L., Puras, G., Zarate, J., Pedraz, J. L., & Fernandez, E. (2015). Enduring high-efficiency in vivo transfection of neurons with non-viral magnetoparticles in the rat visual cortex for optogenetic applications. *Nanomedicine*, 11(4), 835-843. doi:10.1016/j.nano.2015.01.012
- Staiger, H., Stefan, N., Machicao, F., Fritsche, A., & Haring, H. U. (2006). PPARGC1A mRNA levels of in vitro differentiated human skeletal muscle cells are negatively associated with the plasma oleate concentrations of the donors. *Diabetologia*, 49(1), 212-214. doi:10.1007/s00125-005-0061-y
- Streng, A. S., de Boer, D., van der Velden, J., van Dieijen-Visser, M. P., & Wodzig, W. K. (2013). Posttranslational modifications of cardiac troponin T: an overview. *J Mol Cell Cardiol*, 63, 47-56. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.07.004
- Subramanian, V., Uchida, H. A., Ijaz, T., Moorleggen, J. J., Howatt, D. A., & Balakrishnan, A. (2012). Calpain inhibition attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 59(1), 66-76. doi:10.1097/FJC.0b013e318235d5ea
- Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N., & Smuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, 6(7), e21800. doi:10.1371/journal.pone.0021800
- Supinski, G. S., Wang, W., & Callahan, L. A. (2009). Caspase and calpain activation both contribute to sepsis-induced diaphragmatic weakness. *J Appl Physiol (1985)*, 107(5), 1389-1396. doi:10.1152/jappphysiol.00341.2009
- Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., . . . Sakai, J. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 15924-15929. doi:10.1073/pnas.0306981100
- Taylor, J. R., Zheng, Z., Wang, Z. M., Payne, A. M., Messi, M. L., & Delbono, O. (2009). Increased CaVbeta1A expression with aging contributes to skeletal muscle weakness. *Aging Cell*, 8(5), 584-594. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00507.x
- Thompson, L. V., & Brown, M. (1999). Age-related changes in contractile properties of single skeletal fibers from the soleus muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 86(3), 881-886. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066700>

- Timmers, S., de Vogel-van den Bosch, J., Hesselink, M. K., van Beurden, D., Schaart, G., Ferraz, M. J., . . . Schrauwen, P. (2011). Paradoxical increase in TAG and DAG content parallel the insulin sensitizing effect of unilateral DGAT1 overexpression in rat skeletal muscle. *PLoS One*, *6*(1), e14503. doi:10.1371/journal.pone.0014503
- Tomas, E., Tsao, T. S., Saha, A. K., Murrey, H. E., Zhang Cc, C., Itani, S. I., . . . Ruderman, N. B. (2002). Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(25), 16309-16313. doi:10.1073/pnas.222657499
- Tomko, R. P., Xu, R., & Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(7), 3352-3356. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096397>
- Tresilwised, N., Pithayanukul, P., Holm, P. S., Schillinger, U., Plank, C., & Mykhaylyk, O. (2012). Effects of nanoparticle coatings on the activity of oncolytic adenovirus-magnetic nanoparticle complexes. *Biomaterials*, *33*(1), 256-269. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.028
- Trinchese, F., Fa, M., Liu, S., Zhang, H., Hidalgo, A., Schmidt, S. D., . . . Arancio, O. (2008). Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*, *118*(8), 2796-2807. doi:10.1172/JCI34254
- Valentinuzzi, V. S., Buxton, O. M., Chang, A. M., Scarbrough, K., Ferrari, E. A., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2000). Locomotor response to an open field during C57BL/6J active and inactive phases: differences dependent on conditions of illumination. *Physiol Behav*, *69*(3), 269-275. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869592>
- Vlaskou, D., Plank, C., & Mykhaylyk, O. (2013). Magnetic and acoustically active microbubbles loaded with nucleic acids for gene delivery. *Methods Mol Biol*, *948*, 205-241. doi:10.1007/978-1-62703-140-0\_15
- Vosler, P. S., Brennan, C. S., & Chen, J. (2008). Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol*, *38*(1), 78-100. doi:10.1007/s12035-008-8036-x
- Wang, F., Zhang, W., Shen, Y., Huang, Q., Zhou, D., & Guo, S. (2015). Efficient RNA delivery by integrin-targeted glutathione responsive polyethyleneimine capped gold nanorods. *Acta Biomater*. doi:10.1016/j.actbio.2015.05.028
- Wang, K. K., & Yuen, P. W. (1994). Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci*, *15*(11), 412-419. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7855906>
- Wang, Y., Fraefel, C., Protasi, F., Moore, R. A., Fessenden, J. D., Pessah, I. N., . . . Allen, P. D. (2000). HSV-1 amplicon vectors are a highly efficient gene delivery system for skeletal muscle myoblasts and myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*, *278*(3), C619-626. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712251>
- Wang, Y. X., Lee, C. H., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H., & Evans, R. M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, *113*(2), 159-170. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12705865>
- Wang, Z.-M., Messi, M. L., & Delbono, O. (2000). L-type Ca<sup>2+</sup> channel charge movement and intracellular Ca<sup>2+</sup> in skeletal muscle fibers from aging mice. *Biophysical Journal*, *78*, 1947-1954.
- Wang, Z. M., Messi, M. L., Renganathan, M., & Delbono, O. (1999). Insulin-like growth factor-1 enhances rat skeletal muscle charge movement and L-type Ca<sup>2+</sup> channel gene expression. *J Physiol*, *516* ( Pt 2), 331-341. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087334>
- Warren, G. L., Hayes, D. A., Lowe, D. A., Williams, J. H., & Armstrong, R. B. (1994). Eccentric contraction-induced injury in normal and hindlimb-suspended mouse soleus and EDL



- muscles. *J Appl Physiol* (1985), 77(3), 1421-1430. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836148>
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73(2), 309-319. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8477447>
- Widder, K. J., Senyel, A. E., & Scarpelli, G. D. (1978). Magnetic microspheres: a model system of site specific drug delivery in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med*, 158(2), 141-146. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/674215>
- Wilhelm, C., Gazeau, F., & Bacri, J. C. (2002). Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells. *Eur Biophys J*, 31(2), 118-125. doi:10.1007/s00249-001-0200-4
- Wilson, C. L., & Miller, C. J. (2005). Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics*, 21(18), 3683-3685. doi:10.1093/bioinformatics/bti605
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949 Pt 1), 1465-1468. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1690918>
- Zhang, T., Birbrair, A., & Delbono, O. (2013). Nonmyofilament-associated troponin T3 nuclear and nucleolar localization sequence and leucine zipper domain mediate muscle cell apoptosis. *Cytoskeleton*, 70, 134-147. doi:10.1002/cm.21095
- Zhang, T., Birbrair, A., & Delbono, O. (2013). Nonmyofilament-associated troponin T3 nuclear and nucleolar localization sequence and leucine zipper domain mediate muscle cell apoptosis. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 70(3), 134-147. doi:10.1002/cm.21095
- Zhang, T., Birbrair, A., Wang, Z.-M., Taylor, J., Messi, M., & Delbono, O. (2013). Troponin T nuclear localization and its role in aging skeletal muscle. *AGE*, 35(2), 353-370. doi:10.1007/s11357-011-9368-4
- Zhang, T., Birbrair, A., Wang, Z. M., Taylor, J., Messi, M. L., & Delbono, O. (2013). Troponin T nuclear localization and its role in aging skeletal muscle. *Age (Dordr)*, 35(2), 353-370. doi:10.1007/s11357-011-9368-4
- Zhao, X., Cui, H., Chen, W., Wang, Y., Cui, B., Sun, C., . . . Liu, G. (2014). Morphology, structure and function characterization of PEI modified magnetic nanoparticles gene delivery system. *PLoS One*, 9(6), e98919. doi:10.1371/journal.pone.0098919
- Zheng, Z., Wang, Z. M., & Delbono, O. (2002). Insulin-like growth factor-1 increases skeletal muscle dihydropyridine receptor alpha 1S transcriptional activity by acting on the cAMP-response element-binding protein element of the promoter region. *J Biol Chem*, 277(52), 50535-50542. doi:10.1074/jbc.M210526200
- Zhou, X. F., Liu, B., Yu, X. H., Zha, X., Zhang, X. Z., Wang, X. Y., . . . Shen, J. C. (2007). Using magnetic force to enhance immune response to DNA vaccine. *Small*, 3(10), 1707-1713. doi:10.1002/sml.200700151
- Zuhlke, R. D., & Reuter, H. (1998). Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3287-3294. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501255>