



TESIS DOCTORAL

SEÑAL DE CALCIO Y SECRECIÓN DE MIOCINAS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Blanca Calle Ciborro

**Programa de Doctorado en
Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos**

Conformidad del director:

Dra María Cristina Camello Almaraz

Dr Pedro J. Camello Almaraz

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y codirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura

2023



TESIS DOCTORAL

**SEÑAL DE CALCIO Y SECRECIÓN DE MIOCINAS EN EL MÚSCULO
ESQUELÉTICO HUMANO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

Blanca Calle Ciborro

**Programa de Doctorado en
Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos**

2023

Financiación

Este estudio fue financiado por la Junta de Extremadura a través de subvenciones a MJ Pozo/PC Camello (IB18025, Consejería de Economía e Infraestructuras) y a C Camello-Almaraz (GR21095, Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital).

JUNTA DE EXTREMADURA

Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital

El estudio fue aprobado por los Comités Éticos de la Universidad de Extremadura y del Hospital Universitario de Extremadura (ref IB18025).

Producción científica

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han dado lugar a:

Publicaciones:

Calle-Ciborro, B., Espin-Jaime, T., Santos, F. J., Gomez-Martin, A., Jardin, I., Pozo, M. J., Rosado J., Camello-Almaraz, P.J., Camello-Almaraz, C. (2023). Secretion of Interleukin 6 in Human Skeletal Muscle Cultures Depends on Ca²⁺ Signalling. *Biology*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12070968>.

Calle-Ciborro B., Vidal A., Camello-Almaraz C., Casas M., Jaimovich E.J. (2023). Excitation coupled calcium entry (ECCE) in skeletal muscle occurs through pannexin 1 channels and it is linked to frequency -dependent excitation-transcription coupling (Enviado-Journal of General Physiology).

Presentaciones a congresos científicos:

Aging and the effect of nifedipine in Ca²⁺ signals in human skeletal muscle cultures. Calle-Ciborro B., Diaz-Rodriguez N., Espin-Jaime T., Santos F.J., Pozo M.J., Camello P.J., Camello Almaraz C. Badajoz. Septiembre 2022

Role of Ca²⁺ in IL6 secretion in human skeletal muscle cultures. Calle-Ciborro B., Espin-Jaime T., Santos F.J., Pozo M.J., Camello P.J., Camello Almaraz C. Badajoz. Septiembre 2022

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	13
INTRODUCCIÓN.....	17
MÚSCULO ESQUELÉTICO	19
<i>Células satélite</i>	24
<i>Miogénesis</i>	26
<i>Formación de los miofibros</i>	28
CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	29
Aparato contráctil en el músculo esquelético	30
Mecanismo de contracción del músculo esquelético. Acoplamiento excitación-contracción.....	32
Receptores estimulantes en el músculo	35
SEÑALES DE CALCIO y HOMEOSTASIS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO	38
Sistemas de entrada de calcio en el citosol	38
<i>Canales de calcio dependiente de voltaje tipo L</i>	41
<i>Canales de calcio dependiente de voltaje tipo T</i>	41
<i>Entrada de calcio acoplada a excitación (ECCE)</i>	44
Depósitos de calcio intracelular	47
Mecanismos de reducción de la concentración de calcio intracelular	50
<i>PMCA Plasma Membrane Calcium ATPase</i>	51
<i>Intercambiador Na⁺/Ca²⁺</i>	51
<i>SERCA Sarco Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase</i>	52
<i>Panx-1</i>	54
MIOQUINAS.....	55
Interleucina-6.....	56
ENVEJECIMIENTO	65
Concepto y bases celulares	65
Fragilidad y sarcopenia.....	66
Cambios en la homeostasis del calcio inducidos por el envejecimiento	67
MATERIAL Y MÉTODOS.....	73

Cultivos primarios de músculo esquelético humano	75
<i>Aislamiento de cultivos primarios</i>	75
Cultivo primario de músculo esquelético humano	76
Estudio de la secreción de Il-6 en cultivos de músculo esquelético humano.....	78
Estudio de las señales de calcio intracelular	80
Extracción y aislamiento del músculo <i>Flexor Digitorum Brevis (FDB)</i>	82
<i>Modelo animal</i>	82
<i>Eutanasia y extracción de extremidades</i>	82
<i>Disección del músculo Flexor Digitorum Brevis (FDB)</i>	83
<i>Aislamiento fibras musculares del músculo Flexor Digitorum Brevis (FDB)</i>	83
Cuantificación de la entrada de MN^{2+}	84
Western blot	86
<i>Lisado celular</i>	86
<i>Cuantificación de proteínas</i>	87
<i>Electroforesis</i>	87
<i>Transferencia semiseca</i>	88
<i>Incubación de anticuerpos y revelado</i>	88
Transfección.....	91
Expresión del gen il-6.....	91
Estadística	92
CAPÍTULO I.....	93
RESULTADOS.....	95
CAPITULO II.....	101
RESULTADOS.....	103
DISCUSIÓN	113
CAPITULO III.....	117
RESULTADOS.....	119
DISCUSIÓN	122
CAPÍTULO IV	125
RESULTADOS.....	127
DISCUSION	132
CAPITULO V	135

RESULTADOS.....	137
DISCUSIÓN.....	142
DISCUSIÓN GENERAL.....	145
CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFÍA.....	154

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
aa	Aminoácidos
Ach	Acetilcolina
Actina-F	Actina filamentosa
Actina-G	Actina globular
ADP	Adenosin difosfato
AMP	Adenosin monofosfato
AP	Proteína activadora
ATP	Adenosin trifosfato
BHQ	2,5-di-tert-butilhidroquinona
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca²⁺	Ion calcio
CaM	Calmodulina
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
Ca_{v1.1}	Canales de calcio dependientes de voltaje
CBX	Carbenoxolona
CCh	Carbacol
Cfos	Genes tempranos inmediatos
CSQ	Calsecuestrina
DAG	Diacilglicerol
DHPR	Receptores de dihidropiridinas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
Dy	Dynasore
ECC	Entrada capacitativa de calcio
ECC	Acoplamiento excitación-contracción
ECCE	Entrada de calcio acoplada a la excitación (Excitation coupled calcium entry)
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilen glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
ETC	Acoplamiento excitación-transcripción
FAK	Quinasa de adhesión focal
FBS	Suero fetal bovino

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fura-2 AM	Fura-2 acetoximetil éster
gp130	Receptor de tirosina quinasa gp130
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
H⁺	Ion hidrogeno
HRP	Peroxidasa de rábano
HVA	Canales de alto umbral de activación
IFN	Interferón
IL-6	Interleucina 6
IL-6Rα	Proteína alfa del receptor soluble de IL-6
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP₃R	Receptor del Inositol 1,4,5-trifosfato
IRF1	Factor regulador 1 de IFN
JAK2	Janus cinasas 2 citoplasmática
K⁺	Ion potasio
KR Mn²⁺	Solución Krebs-Ringer con manganeso
KR	Solución Krebs-Ringer
LRS	Retículo sarcoplásmico longitudinal
LVA	Canales de bajo umbral de activación
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MBP	Proteínas de unión a miosina
MCK	Creatina quinasa muscular
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MHC	Cadena pesada de la miosina
MLC	Cadena ligera de miosina
MRF	Factores de transcripción miogénicos
mRNA	RNA mensajero
Na⁺	Ion sodio
nAChR	Receptores nicotícos
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NO	Óxido nítrico
ON	Durante toda la noche (over night)
Panx	Panexina
PBS	Tampón fosfato salino

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF-A	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PLC	Fosfolipasa C
PLN	Fosfolambano
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase
q-PCR	PCR a tiempo real
ROI	Región de interés
rpm	Revoluciones por minuto
RS	Retículo sarcoplásmico
RT-qPCR	PCR a tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RYR	Canal-receptor de rianodina
SEM	Error estándar de la media
SERCA	Ca ²⁺ ATPasa de retículo endo(sarco)plasmático (<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i>)
SOcs	Canales de calcio operados por depósitos
SOCE	Entrada de calcio regulada por depósitos intracelulares (<i>Store Operated Calcium Entry</i>)
SLN	Sarcopilina
SNC	Sistema Nervioso Central
SPCA	Secretory pathway Ca ²⁺ ATPase
TZ	Tozilizumab
TF	Factores de transcripción
TnC	Subunidad de troponina de unión a Ca ²⁺
TnI	Subunidad de troponina inhibidora
TnT	Subunidad de troponina de unión a tropomiosina
TPS	Tapsigargina
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
TRP	Transient receptor potential
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VOCC	Canales de calcio operados por voltaje (<i>Voltage- Operated Calcium Channels</i>)

RESUMEN/ SUMMARY

RESUMEN

El músculo esquelético libera durante su activación diversas citoquinas y factores endocrinos colectivamente denominados mioquinas o miocinas. Las miocinas se consideran el factor mediador de los efectos de la actividad física sobre otros tejidos como tejido graso, hueso o sistema nervioso. La IL-6 es una de las principales miocinas debido a sus efectos reguladores sobre metabolismo, reacción inflamatoria, proliferación celular y respuesta inmunológica. El objetivo inicial de esta tesis era estudiar el efecto del envejecimiento sobre la liberación de IL-6 y la señal de Ca^{2+} usando cultivos celulares primarios preparados a partir de células madre musculares de humanos de diferentes edades. Como objetivos secundarios establecimos investigar en estos cultivos el papel de la señal de Ca^{2+} en la secreción de IL-6 en respuesta a ATP y la presencia de sistemas de autorregulación de IL-6, y estudiar en fibras musculares adultas el papel del potencial de membrana en la entrada de Ca^{2+} acoplada a la excitación. Los resultados muestran que el envejecimiento no produce cambios significativos en la secreción de IL-6 en respuesta a varios agonistas en cultivos primarios. Sin embargo, la edad del donante reduce la entrada capacitativa de Ca^{2+} y la participación de los canales $\text{Ca}_{v1.x}$ en la movilización de Ca^{2+} por ATP y despolarización, probablemente por cambios en su acoplamiento con otros elementos reguladores de esta vía como depósitos intracelulares de calcio o el canal de panexina 1. Adicionalmente, hemos encontrado que el potencial de membrana tiene un efecto modulador sobre la entrada de Ca^{2+} acoplada a excitación en fibras musculares adultas. Acerca de los mecanismos de secreción, nuestros datos muestran que la secreción de IL-6 en respuesta a ATP necesita movilización de Ca^{2+} , incluyendo liberación desde depósitos intracelulares y entrada de Ca^{2+} mediante canales capacitativos y de voltaje (limitante en este caso los canales T). La señal de Ca^{2+} actúa mediante la vía calmodulina/calcineurina, y actúa en la fase postranscripcional. Además, hemos demostrado que la propia IL-6 ejerce un efecto de retroalimentación que necesita receptores IL-6R, endocitosis y vesículas de endocitosis ácidas. En conclusión, nuestros resultados sugieren que el envejecimiento de las células madre musculares humanas activa un programa de envejecimiento que puede modificar la funcionalidad de su progenie celular. La secreción de IL-6 en respuesta a ATP es un mecanismo complejo que incluye movilización de Ca^{2+} y un mecanismo autocrino mediado por el compartimento endocítico de la célula.

Palabras clave

Células musculares esqueléticas, cultivos de células musculares, IL-6, envejecimiento, señales de Ca^{2+} , canales de Ca^{2+} , Cav1.x

SUMMARY

Upon activation, the skeletal muscle multiple cytokines and endocrine factors, collectively termed myokines. Myokines are considered the mediator of the effects of the physical activity on other tissues, such as lipid stores, bone or nervous system. IL-6 is one of the most important myokines due to its regulatory effects on metabolism, inflammatory processes, cell proliferation and immune response. The initial aim of this thesis was to study the effect of aging on the IL-6 secretion and the Ca^{2+} signal in primary cell cultures prepared from adult stem cells obtained from human individuals of different ages. As secondary objectives we established to investigate in these cultures the role of the Ca^{2+} signal in the ATP-evoked IL-6 secretion and the presence of feedback regulatory mechanisms by IL-6, and to study in adult muscle fibers the role of the membrane potential on the excitation coupled calcium entry. Our results show that aging does not induce significant changes in the IL-6 secretion induced by several agonists in the primary cultures. However, the age of the donor reduces the capacitative Ca^{2+} entry and the contribution of $\text{Ca}_{v1.x}$ channels to the ATP- and depolarization-induced Ca^{2+} mobilization, probably due to changes in the coupling to other elements of this pathway, such as intracellular calcium pools or pannexin 1 channels. In addition, we have found that membrane potential has a modulatory effect on the excitation coupled calcium entry in adult muscle fibers. Regarding the secretory mechanisms, our data show that ATP-induced IL-6 secretion requires Ca^{2+} mobilization, involving release from internal calcium pools and Ca^{2+} entry through capacitative channels and voltage Ca^{2+} operated channels (limiting in the case of T type channels). Ca^{2+} signal operates through the calmodulin/calcineurin pathway at a posttranscriptional step. Also, we have shown that IL-6 operates a positive feedback loop involving IL-6R receptors, endocytosis and acidic endocytic vesicles. In conclusion, our results suggest that aging of human adult muscle stem cells activate an aging program that can modify the functionality of the cellular progeny. The secretion of IL-6 in response to ATP is a complex mechanism involving calcium mobilization and autocrine loop mediated by the endocytic compartment of the cell.

Keywords

Skeletal muscle cells, muscle cells culture, IL-6, aging, Ca^{2+} signals, calcium channels, $\text{Ca}_{v1.x}$

Agradecimientos

Si puedes leer esto, significa que acabé una de las experiencias más difíciles y bonitas de mi vida. Cuatro años que se resumen aquí, aún no me creo que haya llegado este momento. Cuatro años de poner a prueba el ingenio, el umbral de la decepción, la capacidad de trabajo y el tesón. Cuatro años de montañas rusas de emociones y sentimientos, de victorias y fracasos pero sobre todo, cuatro años de ilusión a borbotones.

Querida María José, gracias por ser artífice de este departamento, gracias por ese correo que llego un día para darme la oportunidad de crecer en este campo, de crecer como persona y de brindarme este departamento cargado de ilusión y ganas en esta profesión.

Queridos Pedro y Cristina, creo que cualquier agradecimiento hacia vosotros no haría sombra a todo lo que os tengo que agradecer. Gracias por confiar en mí desde el minuto uno, por hacer que nuestro laboratorio sea lugar de crecimiento, de trabajo en equipo, de ayuda mutua, de escucha. Gracias por el esfuerzo titánico en estos años, por las temporadas duras, por ir ambos contra viento y marea y pelear por lo que un día levantasteis; gracias por hacerme participe de esa lucha y por enseñarme a valorar esta profesión. Por el aprendizaje diario, por los ánimos cada vez que no podía tirar con todo, por darme alas para volar fuera y confiar tanto en mí; solo puedo decir GRACIAS.

Pedro, gracias por hacer fácil lo difícil, por tu capacidad de transmitir esa pasión por el trabajo, por los ánimos, por la confianza, por las risas para quitarle hierro a todo, por ser una de las personas más admirables que he conocido; por ser la luz al final del túnel de este departamento, por no haber parado esa cabeza durante un minuto estos años y haber dado alas a esta tesis.

Cristina, gracias por ser la calma, como siempre te digo “nuestra zona neutral”, por hacerme respirar frente a todo, mantener la calma pero siempre el tesón; por ser ánimo y preocupación, la parte optimista del pesimismo, el empujoncito diario. Gracias por estar siempre ahí, por ser los ratitos de locura en las mañanas frenéticas, las risas frente a las temporadas de estrés, por ser el paso firme y “la calma en medio de la tempestad” de esta tesis; no he podido tener mejor directora.

Gracias Puri por ser los buenos días cargados de ánimos, los “ya queda menos” cuando las semanas se hacían cuesta arriba o los ánimos para irme al otro lado del mundo. Gracias Ana por ser el último empujoncito al final de este camino, por estar pendiente de mí; por los ánimos y esa mano tendida constante, aunque del fin de semana se tratase. Gracias a Gregoria por estar siempre dispuesta a cada experimento y rendir como nadie.

Cuando me preguntan que si repetiría esta etapa me llena de orgullo responder que podrá haber cosas que cambiaría, pero lo que repetiría sin lugar a duda sois vosotros. Ojalá y nadie cambie vuestra esencia, porque nadie sabe la suerte que es tener a personas como vosotros trabajando codo con codo, formando un departamento donde crecer, pero, sobre todo, donde te dejan ser.

Gracias profesor Jaimovich, a usted y todo su equipo, por recibirme con los brazos abiertos, por haberme enseñado tanto en tan poco tiempo. Gracias por haber confiado

en mi como profesional y haberme hecho sentir tan bien en su departamento. Fue un honor conocerle y poder trabajar con la persona que tanto admiro por tantos años de dedicación y entrega en este campo.

Gracias Andrea por ser mi apoyo en Chile, por haberme cuidado tanto allí, por haber sido la mejor compañera de laboratorio y convertirme en una gran amiga, por seguir en esta aventura, aunque estemos con un océano de por medio. Fue una suerte encontrar tan lejos a alguien tan especial como tú.

Al 1202, por ser hogar al otro lado del mundo, por cuidarme como si fuerais mi familia. Y a ti Ena, eres la persona con más luz que jamás conocí. Gracias por seguir.

A mis amigas, las que llevan conmigo desde que me alcanzan los recuerdos, a las que aparecieron para quedarse, a las que la loca ciencia me regaló o las que esta etapa la completaron; por las que me aguantan diariamente o las que lo hacen a kilómetros. Habéis sido mis personas vitamina de todo este proceso, gracias por no soltarme nunca.

A Sandra y Patri, gracias por el día a día, gracias por no dejar de confiar en mí.

A Natalia, por ser lo mejor que me ha dado esta tesis. Ojalá seguir formando siempre esté equipo contigo.

A ti Ángeles, gracias por haber sido un apoyo diario en una etapa más, por apoyarme en cada una de mis decisiones, por ser la amistad más incondicional a lo largo de mi vida y corroborar que se puede considerar a alguien hermana, aunque no sea de sangre.

A mi familia, por qué sin ellos nada sería posible. A mis padres y mi hermana por ser el motor de mi vida, por darme fuerzas y alas en todo lo que me propongo. Gracias por el apoyo y la preocupación, por los valores que nos habéis transmitido a ambas, por no dejar que me rendiese nunca y siempre enseñarme que solo se fracasa cuando no se intenta y que solo gana el que nunca se rinde. No sería nada sin vosotros.

Y a ti abuela, aquí sigues con nosotros.. todo esto es por ti.

INTRODUCCIÓN

MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es un órgano altamente dinámico responsable de la locomoción, la postura corporal y la ventilación pulmonar, siendo además fuente de calor corporal y uno de los principales tejidos en la homeostasis metabólica. Destaca por presentar una gran especialización estructural y una alta plasticidad. En los seres humanos, el músculo esquelético comprende aproximadamente el 40 % del peso corporal total y contiene un 50-75% del total de proteínas del cuerpo. Está compuesto principalmente por agua (75 %), proteínas (20 %) y otras sustancias, como sales inorgánicas, minerales, grasas y carbohidratos (5 %). La masa muscular tiene una dependencia directa del equilibrio existente entre síntesis y la degradación proteica. Este equilibrio se rige por el estado nutricional, niveles hormonales, actividad física y enfermedades entre los factores más destacables (Frontera and Ochala, 2014).

La contracción muscular, como función básica de este tejido, confiere un papel principal a la conversión de energía química en energía mecánica para generar fuerza, explicando la importancia del músculo esquelético en el metabolismo energético (Wolfe, 2006). Además, la investigación en las dos últimas décadas ha revelado su función como un órgano endocrino, capaz de producir y secretar una larga lista de mensajeros intercelulares denominados miocinas (Benatti and Pedersen, 2015). Estas miocinas liberadas median efectos metabólicos y antiinflamatorios contribuyendo así a participar en los efectos preventivos de la actividad física contra diversas enfermedades crónicas. Esta función endócrina del músculo es descrita de forma detallada en el apartado de miocinas.

El músculo esquelético está compuesto por haces de células o fibras musculares (miofibras) denominados fascículos y delimitados por tejido conectivo denominado perimisio. Los grupos de fascículos forman cada músculo como unidad anatómica, está rodeado por una capa conectiva conocida como epimisio (Javan et al., 2013; Lieber, 2009) (*Figura 1*). Las fibras musculares contienen en su citosol una gran cantidad de filamentos proteicos de estructura repetitiva estriada, denominados miofibrillas, que al deslizarse unos sobre otros se acortan para producir la contracción muscular.

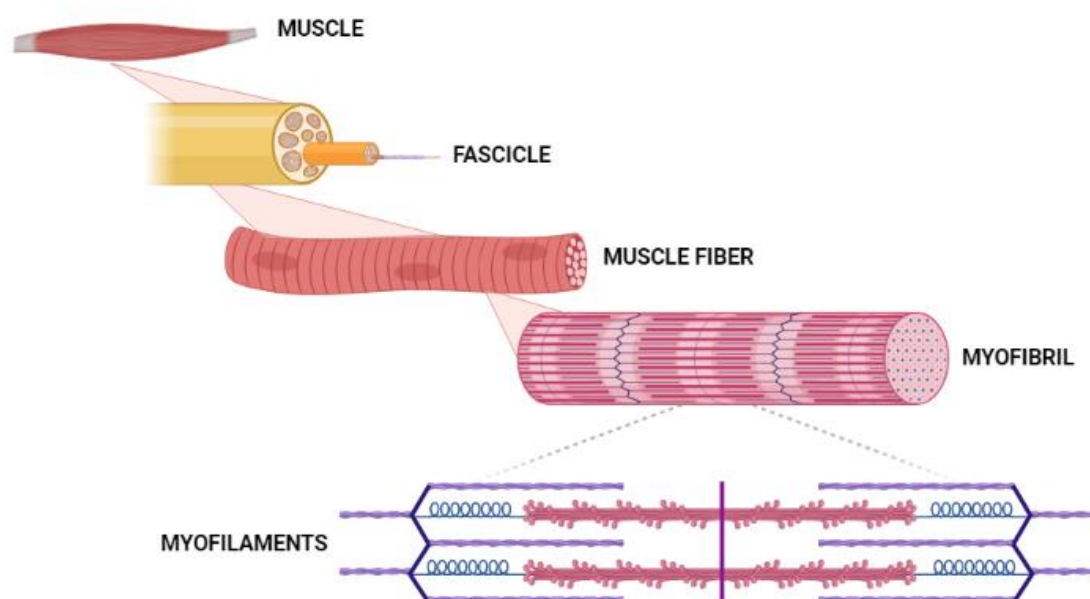


Figura 1. Estructura y niveles de organización del músculo esquelético.

La membrana plasmática de cada fibra muscular, denominada sarcolema, está asociada a un complejo de varias proteínas conectado físicamente a las miofibrillas o miofilamentos, particularmente a la proteína actina presente en el filamento delgado. La ausencia (parcial o completa) o la disfunción de una de estas proteínas puede provocar daño al sarcolema, debilidad muscular y atrofia (Thomas et al., 2013). Las fibras musculares son células multinucleadas; cada núcleo tiene control sobre la síntesis proteica de la zona donde se encuentre su fibra muscular ubicada, conociéndose estas regiones como dominios nucleares (Hikida et al., 2011).

El tamaño del músculo viene dado por el número de fibras musculares individuales y las dimensiones que estas posean (Javan et al., 2013). Para que el músculo esquelético tenga un crecimiento y una regeneración muscular óptima existen unas células encargadas de ello, las células satélite. Estas células se ubican entre el sarcolema y la lámina basal que lo rodea (Hikida et al., 2011; Macaluso and Myburgh, 2012). Se encuentran inactivas para evitar un crecimiento incontrolado; cuando existe una situación de estrés o el músculo sufre algún tipo de lesión son activadas por factores miogénicos, éstas comienzan a proliferar y diferenciar dependiendo de los requerimientos del músculo en base a un crecimiento o reparación (Bareja et al., 2014).

La resistencia mecánica de la fibra muscular a los esfuerzos repetidos de contracción y relajación se debe al citoesqueleto. El citoesqueleto muscular es un entramado de proteínas complejo el cual funciona como un “andamio” estructural y base de apoyo para los miofilamentos contráctiles del músculo. El citoesqueleto incluye una red subsarcolema, un sistema de conexión transversal con esta red y un complejo proteico que conecta los extremos de las miofibrillas con los pliegues del sarcolema (Mukund and Subramaniam, 2020).

Proteínas Musculares

Una fibra muscular está compuesta, en su mayoría, por diferentes tipos de proteínas (citoesqueléticas, reguladoras y contráctiles) y por el sarcolema, no superando este el 10% de la totalidad (Gelfi et al., 2011). Cada fibra muscular puede contener miles de miofibrillas constituidas por miles de miofilamentos proteicos cuya función es la contracción muscular. Los miofilamentos más abundantes en el músculo esquelético son la actina y la miosina, que comprenden aproximadamente el 70-80 % del contenido total de proteínas de una sola fibra (Ottenheijm et al., 2010). Cabe destacar por su relevancia funcional la presencia de diversas proteínas reguladoras, especialmente el complejo troponina-tropomiosina, que está asociado a la actina y es fundamental, junto a la miosina, para el proceso de la contracción muscular (Monroy et al., 2012). Parte de estas proteínas contribuyen a la integridad del sarcómero, pudiendo ser relevantes para el ensamblaje de miofibrillas y la señalización celular.

Orgánulos

En el sarcoplasma o citosol de las fibras musculares encontramos una serie de orgánulos cuyo número varía dependiendo del tipo de fibra. Como orgánulo característico de este tipo celular destacan los túbulos transversos o túbulos T, implicados en la conducción del potencial de acción al interior celular. Los túbulos T parten del sarcolema, con la luz en contacto con el exterior de la célula, y penetran en el cuerpo de la fibra muscular formando una red que asegura que la excitación se extienda uniformemente por toda la fibra (Jayasinghe and Launikonis, 2013; Kerr et al., 2014).

Morfológicamente, el retículo sarcoplásmico (RS) es un sistema de membranas intracelulares que rodea a las miofibrillas del músculo formando una cisterna donde se almacena el Ca^{2+} . El RS se encuentra dividido en compartimentos que, junto al túbulo transversos T en el músculo esquelético, forma una serie de estructuras denominadas tríadas o RS de unión (JRS) (Franzini-Amstrong et al., 2005; Van, 1979). En dichas uniones triádicas, cuando las fibras musculares son sometidas a un estímulo, se da la liberación de Ca^{2+} por el RS en respuesta a la despolarización del túbulo transversos T (Franzini-Amstrong et al., 1970).

Las mitocondrias también forman parte de los organelos del músculo esqueléticos. Generan la energía necesaria para distintas funciones musculares. Estas mitocondrias tienen diversas localizaciones, como zonas próximas del sarcolema o espacio intermiofibrilar (Dahl et al., 2014).

Heterogeneidad del musculo esquelético. Tipos de fibras musculares

El músculo esquelético se caracteriza por presentar una gran heterogeneidad fruto de la variabilidad que presentan las fibras musculares. La presencia de fibras con diferentes propiedades y características en un mismo músculo refleja una adaptación a diferentes patrones de actividad. La existencia de fibras funcionalmente diversas otorga al músculo la capacidad de adaptarse no solo a actividades con diferentes demandas

metabólicas y mecánicas, sino a otros procesos como envejecimiento, inactividad o enfermedad (Lui et al., 2012).

Las fibras musculares se clasifican según diferentes criterios siendo los más destacables el color que presenten las fibras (rojas o blancas), las propiedades contráctiles de las unidades motoras en respuesta a la estimulación eléctrica, velocidad de acortamiento (rápida o lenta), predominio de ciertas vías metabólicas o enzimáticas (oxidativa o glucolítica), grado de fatigabilidad frente a un estímulo sostenido en el tiempo (fatigable o resistente a la fatiga), movilidad del Ca^{2+} por parte del retículo sarcoplásmico (rápido o lento) y expresión de isoformas de proteínas entre otras características. Se correlaciona la velocidad de contracción con el desarrollo del retículo, mientras que la tolerancia a la fatiga y capacidad oxidativa se encuentra relacionado con el contenido mitocondrial en el músculo (Galpin et al., 2012).

Existen dos tipos de fibras principales las que predominan en el músculo esquelético, las fibras de contracción lenta (Tipo I) y fibras de contracción rápida (Tipo II); a su vez esos dos tipos contienen los subtipos IIA, IIB y IIX. Se reconoce que el patrón de especialización de las fibras de tipo II depende de los patrones de expresión de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina durante la histogénesis (Exeter and Connell, 2010).

Se han encontrado múltiples diferencias a nivel fenotípico y fisiológico entre las fibras de contracción lenta o tipo I y las fibras de contracción rápida o tipo II. A nivel fenotípico, las fibras lentas se encuentran altamente vascularizadas, con una gran cantidad de mitocondrias y exhiben un alto contenido de enzimas mitocondriales y oxidativas con baja actividad glucolítica. Estas fibras tienen como característica principal la resistencia a la fatiga y su dependencia del metabolismo oxidativo para la obtención de la energía. Las diferencias son notorias con respecto a las fibras rápidas ya que estas presentan tiempos de contracción más rápidos, no poseen esta resistencia a la fatiga y destacan por tener una alta capacidad glucolítica que garantiza una generación adecuada de ATP para compensar la tasa acelerada de la hidrólisis de este compuesto (Mukund and Subramaniam, 2020).

Si se valora a estas fibras desde el punto de vista fisiológico, las diferencias entre los músculos de contracción rápida y lenta se basa principalmente en la cinética del calcio, mecanismos de entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC) y actividad motora.

Las fibras rápidas permiten la generación de señales transitorias de calcio (elevaciones en la concentración de Ca^{2+} citosólico) de forma rápida y amplia con escasa entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular y una mayor abundancia de canales de rianodina (RyR) y Ca^{2+} ATPasa de retículo sarcoendoplasmático (SERCA) (Reggiani and Kronnie, 2006). Estas fibras están dotadas de una maquinaria contráctil fuerte y presentan una rápida velocidad de acortamiento sarcomérico y una mayor potencia mecánica. Estas fibras difieren mucho con las lentas, puesto que presentan una contracción mucho más lenta, generan menor potencia mecánica con menor gasto de ATP (Rivero et al., 1998).

FORMACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético se forma a partir de células precursoras del mesodermo paraxial. Deriva de los somitas los cuales se forman durante el desarrollo embrionario temprano en una secuencia rostrocaudal a lo largo del tubo neural y la notocorda (Christ and Ordahl, 1995). Los tejidos que componen el músculo esquelético, a pesar de tener diferentes orígenes anatómicos, se caracterizan por presentar una homogeneidad a nivel molecular, celular e histológico (Flück and Hoppeler, 2003).

La diferenciación de los músculos depende de señales basadas en los genes *Panx-3* y *Panx-7* seguida de activación de los factores de transcripción miogénicos (MRF) como *MyoD* y *Myf-5* (Mok et al., 2011). Las células miogénicas que expresan *Myf5* y *MyoD* se denominan mioblastos (Shi and Garry, 2006). La regulación de los MRF secundarios (*MRF-4* y miogenina) induce la diferenciación terminal de los mioblastos en miocitos los cuales también expresan genes importantes para las células musculares, como la cadena pesada de miosina (MHC) y la creatina quinasa muscular (MCK).

La familia *MyoD* desempeña un papel fundamental en la formación de mioblastos siendo demostrado a través de estudios en mutantes dobles *Myf5/MyoD*, en los que se corroboró que en ausencia de este factor miogénico no se forma el músculo esquelético debido a la ausencia de mioblastos precursores. También se demostró que la ausencia de esos factores conlleva a que las células somitas que darían lugar a mioblastos no se ubiquen de manera correcta en los sitios de miogénesis y adopten otros destinos celulares (Tajbakhsh et al. 1996); esto pone de manifiesto la importancia de *MyoD* en la formación del músculo esquelético (Rudnicki et al. 1993). Otros factores implicados en la diferenciación de los mioblastos en células musculares son *Mrf4* y miogenina (Black & Olson, 1998).

Durante este periodo de la miogénesis, el cual se desarrollará posteriormente, se establece un compromiso de las células progenitoras mesodérmicas con la formación del músculo esquelético dándose una diferenciación celular seguida de una migración, fusión de mioblastos y maduración de las fibras esqueléticas formadas (Buckingham et al., 2003).

Los mioblastos comprenden poblaciones celulares heterogéneas pudiéndose apreciar desde las primeras etapas del desarrollo muscular. Existen diversos aspectos que marcan esta heterogeneidad siendo los más destacables el origen embrionario de los músculos, la existencia de sucesivas oleadas de formación de fibras musculares dando lugar a fibras de generación primaria y secundaria y la distinción temprana de mioblastos de tipo rápido y lento (Schiaffino and Reggiani, 1996).

Durante la fase tardía de la miogénesis embrionaria, una población de células progenitoras o precursoras miogénicas no logra diferenciarse y permanece fuertemente asociada a las miofibras como células satélite, que permanecen en un estado indiferenciado inactivo (Chargé and Rudnicki, 2004; Lehka and Rędowicz, 2020).

La activación de células satélite inactivas y su posterior proliferación y diferenciación tiene como resultado una población competente de mioblastos (Weintraub et al., 1991; Campion, 1984). Estos mioblastos maduros a través de procesos de migración,

elongación, reconocimiento mioblasto-mioblasto, mioblasto-miotubo y, fusión de membranas dan lugar a la fusión y formación de miotubos maduros.

Diversos estudios proteómicos del desarrollo del músculo esquelético han mostrado la importancia del cambio de proteínas durante la diferenciación de mioblastos, la formación de miotubos y el crecimiento muscular. Estudios en roedores han esclarecido que la conversión de mioblastos a miocitos está asociada con una mayor expresión de todas las principales proteínas contráctiles incluidas α -actina, actina F, tropomiosina, troponina, miosina pesada rápida y lenta (MHC) y miosina ligera (MLC) (Tannu et al., 2004; Kislinger et al., 2005; Gonnet et al., 2008; Henningsen et al., 2010).

Después de la maduración, las unidades motoras adultas siguen siendo muy plásticas y su composición proteica puede verse influida por diversos factores como los niveles de actividad neuromuscular, cambios crónicos en los patrones de inervación, diversos tipos de entrenamiento, denervación, lesiones o envejecimiento natural entre otros.

Células satélite

Las células satélite son células miógenas mononucleadas inactivas ubicadas dentro de la lámina basal que rodea las miofibras individuales, entre la membrana basal y la membrana plasmática de la fibra muscular. Destacan por garantizar la homeostasis y por ser iniciadoras y partícipes de procesos de reparación de tejidos tras daños en él (Feige et al., 2018). Esta población celular es heterogénea y difiere tanto en los patrones de expresión que presentan como en el potencial de diferenciación miogénica (Kuang et al., 2007).

Desde el punto de vista morfológico, este tipo celular posee un abundante citoplasma, un pequeño núcleo con una alta cantidad de heterocromatina y un contenido reducido de orgánulos; esta morfología refleja su baja actividad tanto mitótica como transcripcional (Chargé and Rudnicki, 2004). Las células satélite no se encuentran en toda la extensión del músculo por igual, dándose un contenido mucho mayor cerca de las fibras musculares lentas en comparación con las fibras musculares rápidas dentro del mismo músculo; también está presente de forma más abundante en uniones neuromusculares debido a los requerimientos que presentan.

Las células satélites aparecen como población durante la semana diez a catorce del desarrollo de las extremidades humanas. Diversos resultados experimentales avalan la importancia del papel de los genes *Pax3* y *Pax7* en la especificación de células progenitoras al linaje de células satélite (Wagers and Conboy, 2005), aunque aún no existen evidencias con el suficiente peso para aclarar si dichos genes contribuyen solo a la especificación o también a la supervivencia de los progenitores de células satélite (Zammit et al., 2004).

El músculo esquelético tiene la capacidad de regenerarse llevando a cabo una reparación completa del mismo, pudiéndose dar este proceso de forma repetida a lo largo del tiempo. Las células satélites poseen la capacidad de regenerarse repetidamente

proporcionando al músculo esquelético los componentes necesarios para la reparación y reconstrucción de zonas dañadas como de renovarse después de cada proceso regenerativo.

La regeneración muscular es un proceso altamente organizado el cual que implica la activación y migración de las células satélite al lugar de la lesión, su proliferación y diferenciación en fibras musculares. Los eventos de migración y proliferación en la zona donde se ubica la lesión están impulsados por quimioatrayentes, principalmente factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de insulina, y el factor de crecimiento de hepatocitos. También son importantes patrones moleculares asociados a daño (Hindi and Kumar, 2016; Lotze et al., 2007) y citocinas como $TNF\alpha$ y $TGF\beta$, liberadas por las células residentes e inflamatorias infiltrantes (Allen and Boxhorn, 1989; Christov et al., 2007; Sheehan and Allen, 1999; Tidball and Villalta, 2010).

Para este proceso de regeneración también se requieren estructuras de unión intercelular que promuevan la adhesión entre células y regulen la arquitectura del citoesqueleto intracelular. Las moléculas encargadas de esta regeneración son la M-cadherina y M-calpaína. La M-cadherina es una molécula de adhesión intracelular dependiente de Ca^{2+} que se expresa en las células del músculo esquelético y en los mioblastos, aumentando su expresión en las células satélite activadas después de una lesión (Charlton et al., 1997). Está implicada en el desarrollo del músculo esquelético, particularmente en la fusión de mioblastos en miotubos durante la miogénesis embrionaria y la regeneración muscular (Kaufmann et al., 1999). Por el contrario, M-calpaína está implicada en la reorganización la arquitectura del citoesqueleto durante la fusión de mioblastos, siendo una proteasa intracelular no lisosomal dependiente de Ca^{2+} y precursora de modificaciones en la organización de la membrana y el citoesqueleto para la fusión de mioblastos (Dourdin et al., 1999).

Las células satélite musculares se consideraron la única fuente de células miogénicas en la reparación muscular. Actualmente, existen evidencias que corroboran la existencia de células madre multipotenciales en varios tejidos adultos, estando predeterminadas a un linaje específico aquellas células madre que son específicas de un determinado tejido. Las células progenitoras aisladas de la médula ósea, la musculatura adulta, el compartimento neuronal y diversos tejidos mesenquimales pueden diferenciarse en el linaje miogénico (Ferrari et al., 1998; Galli et al., 2000; Young et al., 2001; Labarge and Blau, 2002; Qu-petersen et al., 2002; Karalaki et al., 2009)

Se ha propuesto que la vía JAK-STAT, activada por diversas citocinas, tiene un papel central en la diferenciación miogénica temprana (Wang et al., 2008) y en la proliferación y diferenciación de células satélite (Doles and Olwin, 2014). Durante la regeneración, una parte de células satélite tiene la capacidad de inactivarse para mantener la reserva celular; existen evidencias de que STAT3 modula el potencial de autorrenovación de las células satélites durante la regeneración muscular (Zhu et al., 2016). STAT3 también estaría relacionado con la proliferación de estas células de una manera dependiente de IL-6 tras la lesión (Toth et al., 2011). p38MAPK participa como un modulador el cual promueve la miogénesis a través de la regulación de la activación de MRF (Lluís et al., 2006).

En cuanto a su capacidad de autorrenovación existen diversas hipótesis, siendo la división asimétrica la hipótesis más aceptada de mantenimiento del conjunto de células satélite. Dicha hipótesis mantiene que las células satélite se dividen asimétricamente durante la fase de la mitosis dando lugar a dos células hijas con características y funcionalidad muy diferente. La división asimétrica tiene lugar cuando es reconocida una lesión o cuando ocurre una interacción con células inflamatorias; posteriormente las células satélites ingresan al ciclo celular e inician la proliferación y diferenciación. Una parte de las células satélites activadas se diferenciará en mioblastos para reponer las miofibras y reparar el tejido muscular en ocasiones puntuales, mientras que otras se autorrenovarán y regresarán al nicho para mantener una cantidad óptima de células madre inactivas (Zammit et al., 2006; Shinin et al., 2006). Estas células madre inactivas se denominan células satélite o quiescentes, las cuales se encuentran ubicadas debajo de la lámina basal. Estas células forman los reservorios del músculo esquelético para la renovación muscular y homeostasis del tejido o reparar el músculo en caso de lesión-rotura (Schmalbruch and Lewis, 2000; Pellettieri and Alvarado, 2006). La exposición a diversas situaciones de estrés o daño muscular promueven una activación de las células satélite seguida de una división asimétrica para mantener un grupo de células satélite a través de la autorrenovación y, a su vez, generar una progenie de mioblastos comprometidos. El desencadenante de esta activación es el evento que controla la transición de quietud a proliferación celular (Puri and Sartorelli, 2000; Chargé et al., 2004). Estas células tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse, dando lugar a mioblastos competentes, siendo necesarios para la formación de los miotubos a través de su fusión (Weintraub et al., 1991; Campion, 1984).

La presencia de las células satélite se puede ver modificada con la edad. Los estudios respecto a este tema aún no han solucionado a todas las incógnitas. Se ha propuesto que puedan existir restricciones en la capacidad de autorrenovación de estas células, por lo que existiría un agotamiento de las reservas después de varias rondas de regeneración y esto contribuiría al deterioro clínico observado en los ancianos o en pacientes con miopatías (Chargé and Rudnicki, 2004; Chen and Goldhamer, 2003).

Miogénesis

Todos los músculos esqueléticos del cuerpo derivan de los somitas; a medida que el somita madura, las células progenitoras miogénicas quedan confinadas a la parte dorsolateral del somita, el dermomiótoma. En esta localización, las células miogénicas experimentan la miogénesis esquelética. Se define la miogénesis como el proceso de determinación y formación de las células del tejido muscular (Biressi et al., 2007; Buckingham et al., 2003).

Este evento se inicia en la embriogénesis donde se establece un patrón muscular básico y continua en el desarrollo fetal y neonatal, etapas que engloban el crecimiento y maduración del tejido muscular esquelético. La miogénesis no solo se experimenta en la etapa embrionaria, en el periodo adulto también existe una reparación de los tejidos tras una lesión por lo que también se daría dicha etapa siendo la miogénesis adulta. Independientemente del tipo de miogénesis, se pueden distinguir cuatro fases: la activación de las células progenitoras, la proliferación de la población de células, la

diferenciación de estas en mioblastos y la fusión de mioblastos maduros para dar lugar a la formación de miotubos (Le Grand et al., 2007; Chargé and Rudnicki, 2004; Tajbakhsh et al., 2009).

Como se ha citado anteriormente, las células satélite son aquellas células progenitoras maduras en estado quiescente que, tras su exposición a estrés o daño muscular proliferan y diferencian hasta desarrollar mioblastos competentes implicados en la reparación muscular (Schmalbruch and Lewis, 2000; Pellettieri and Alvarado, 2006; Weintraub et al., 1991; Campion, 1984). En esta etapa tienen lugar múltiples señales intracelulares entre las que destaca la síntesis de óxido nítrico; que promueve la liberación del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) el cual activa las células satélite.

Los factores de crecimiento secretados estimulan también la miogénesis, la cual se encuentra regulada por diversas moléculas efectoras destacando factores de crecimiento análogos a insulina (IGFs), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y los factores de crecimiento transformantes- β (TGF- β). Existen múltiples evidencias que respaldan a FGF como inductor de la cascada de señalización MAPK promiogénica y MAPK p38 α / β necesarias para la activación celular y la regulación del estado de reposo (Chargé and Rudnicki, 2004; Wozniak and Anderson, 2006; Takaesu et al., 2006).

El potencial miogénico de las células satélite depende de la expresión de los genes *pax*, los factores reguladores miogénicos (MRF) como MyoD, Myf5, miogenina, MRF4 y las vías de señalización Wnt y Notch. Tras la activación, las células satélite necesitan factores de transcripción que inicien la proliferación siendo *Pax3*, *Pax7*, Myf5 y MyoD. La población de células ya activa abandonan su localización y se desplaza fuera de la lámina basal expresando simultáneamente *Pax7* y MyoD. Ha sido demostrado que *Pax3*, *Pax7* y MRF son necesarias tanto para la progresión de los mioblastos esqueléticos a través de la miogénesis como para el mantenimiento y autorrenovación de la población de células satélite; a diferencia del proceso de diferenciación, el cual se inicia con la regulación a la baja de Myf5 y, posteriormente, MyoD1 (Seale et al., 2000; Kuang et al., 2006; Yin et al., 2013; Feige et al., 2018).

Durante el proceso de la división asimétrica de las células satélite, destaca el papel de la proteína de membrana Numb, que se segrega asimétricamente durante la mitosis previa a la diferenciación. Esta proteína deprime la vía de señalización Notch-1, la cual promueve la proliferación de células precursoras miogénicas. Se ha comprobado que bajos niveles de Numb en las células resultantes tras la división asimétrica pueden permitir la regulación positiva de la vía Notch-1 y dar lugar a una proliferación continua de las células satélite (Shinin et al., 2006; Conboy and Rando, 2002). Todo esto avala a Numb, Notch-1 y a la división asimétrica como responsables de la renovación de la población de células satélite.

Posteriormente, estas células satélite proliferan hasta que se alcanza el óptimo; para esto los factores de transcripción miogenina y MyoD detienen el ciclo celular para iniciar la diferenciación de las células progenitoras en mioblastos. Destaca *Pax7* como inductor de la proliferación de mioblastos y del retraso de la diferenciación mediante la regulación de MyoD (Zammit, 2006; Olguin et al., 2007).

Para la diferenciación de las células satélite a mioblastos, se requiere la activación de tres familias de factores de transcripción: factor regulador miógeno (MRF), factor potenciador de miocitos 2 (MEF2) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT). También es crucial las señales de Ca^{2+} para la activación de NFAT y MEF2 (Bentzinger et al. 2012).

A diferencia de los genes *Pax3* y *Pax7*, *MyoD* y *Myf5* poseen funciones específicas claramente definidas en la biología de las células satélite. *MyoD* es necesario para el potencial de diferenciación de los mioblastos esqueléticos, al igual que su expresión junto a *Pax7* frente a una lesión (Zammit et al., 2004; Sabourin et al., 1999; Cornelison et al., 2000), mientras que *Myf5* regula su tasa de proliferación y homeostasis (Gayraud-morel et al., 2007).

En la última etapa se origina la fusión de mioblastos y origen de miotubos, los cuales a través de miogenina y MRF4 fusionan entre sí para dar lugar a las miofibras (Le Grand et al., 2007). Los factores de diferenciación miogenina y MRF4 no participan en el desarrollo o mantenimiento de las células satélite (Gayraud-morel et al., 2007), pero la inducción de miogenina es necesaria y suficiente para la formación de miotubos y fibras. Existen evidencias que sugieren que la ausencia de miogenina impide que los mioblastos esqueléticos contribuyan al crecimiento muscular posnatal (Knapp et al., 2006).

Formación de los miotubos

El proceso de formación de miotubos se inicia con la fusión de los mioblastos formados tras la diferenciación de las células progenitoras o las células satélite. Podemos diferenciar dos fases. En la primera fase se produce la fusión mioblasto-mioblasto, propia del desarrollo embrionario, y que da lugar a células multinucleadas iniciales como paso previo a la formación de miotubos nacientes. Esta fase incluye la migración, adhesión y alargamiento de los mioblastos, el reconocimiento célula-célula y la posterior fusión de las membranas de los mioblastos, que da lugar a la formación de miotubos nacientes multinucleares los cuales, tras un proceso de diferenciación, dan lugar a miotubos maduros. Esta fase está altamente regulada por diferentes vías de señalización y multitud de genes para asegurar la formación de miotubos funcionales (Krauss et al., 2017; Brukman et al., 2019).

En una segunda fase, presente tanto en el desarrollo embrionario como en el crecimiento muscular, los mioblastos se fusionan con miotubos ya formados, dando lugar a miotubos en crecimiento con un alto número de núcleos. La adición extra de células mononucleares hace que el miotubo en formación aumente su tamaño y contenido citoplasmático. Esta segunda etapa de crecimiento muscular engloba también un mantenimiento del músculo por lo que está presente a lo largo de toda la vida (Hindi et al., 2013).

Volviendo a la migración de mioblastos, éstos forman grupos de células alargadas que se alinean para establecer contacto y reconocimiento entre sí. El desencadenamiento

de la migración depende de la dinámica del citoesqueleto y de moduladores positivos como interleucina 4, el receptor CD164, CCL5, PDGF-A (factor de crecimiento derivado de plaquetas), y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos (Blanchoin et al., 2014; Corti et al., 2001; Bischoff, 1986). La familia Rho de guanosina trifosfatasa (GTPasas) es crucial en la reorganización del citoesqueleto y la activación de quinasas posteriores (Hindi et al., 2013).

El proceso de elongación engloba interacciones entre diferentes tipos de moléculas como enzimas remodeladoras de la matriz, proteínas citoesqueléticas e integrinas. Esta elongación colabora en el reconocimiento célula-célula de mioblastos en el que también participan proteínas transmembrana como cadherinas N y M, caveolina-3, moléculas de adhesión de células neuronales y vasculares (CAM N y V) e integrinas clásicas (Willkomm and Bloch, 2015).

Tras el reconocimiento mioblasto-mioblasto se produce la fusión de las membranas de mioblastos y la formación de un poro que permite la transferencia del citoplasma y el núcleo del mioblasto a la célula fundadora, siendo este evento el paso previo a la fusión total de mioblastos en la (Kim et al., 2015b). Estos mioblastos deben adherirse entre sí y deben fusionar las valvas de las membranas externas de ambos, dando como resultado una mezcla de lípidos y la formación de un tallo de membrana intermedio; este proceso es asistido por maquinarias de fusión proteica (Petraný et al., 2019). Aunque aún no se conocen muchos detalles de los mecanismos de este proceso, se ha descrito la participación de dos proteínas de fusión de mioblastos esenciales específicas del músculo, Myomaker y Myomerger (o Minion o Myomixer respectivamente) las cuales catalizan la reacción de fusión de membranas en los mioblastos. Estas proteínas son codificadas por los genes MTMK y MYMX respectivamente, con un alto nivel de expresión en mioblastos y miotubos (Millay et al., 2013; Quinn et al., 2017; Zhang et al., 2017).

Una vez ocurre la fusión de membranas, existen proteínas que cooperan con las integrinas para llevar a cabo y controlar la fusión de mioblastos, encontrándose entre ellas la quinasa de adhesión focal (FAK), la cual modula moléculas esenciales para la regulación del citoesqueleto de actina, y las vías MAPK quinasa y Wnt implicadas en la fusión (Schaller et al., 2010; Hindi et al., 2013). Esta fusión también depende en gran medida de la concentración de iones Ca^{2+} intracelulares (Wakelam, 1985).

CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular es el desencadenante de la contracción muscular esquelética. En este apartado se describe tanto la composición fisiológica del aparato contráctil como los mecanismos que conducen a la contracción del músculo. Se evalúa el acoplamiento excitación-contracción (EC) siendo la secuencia de eventos que ocurren desde la generación de un potencial hasta la contracción muscular.

Aparato contráctil en el músculo esquelético

El músculo esquelético se caracteriza una alta complejidad estructural reflejada en la heterogeneidad de proteínas a nivel molecular habiéndose identificado más de dos mil (Canepari et al., 2010). La organización de las proteínas contráctiles da lugar a la formación de las miofibrillas. El músculo esquelético destaca por presentar un sistema denominado actino-miosina constituido por actinas (Domínguez et al., 2011), troponina (Swartz et al., 2006), tropomiosina (Gunning et al., 2008), α -actinina (Ichinoseki-Sekine et al., 2012), nebulina (Pappas et al., 2011) y titina (Ottenheijm et al., 2010), proteínas auxiliares como la proteína de unión a miosina (Ackermann and Kontrogianni-Konstantopoulos, 2011) y diversas isoformas proteicas de cadena ligera (MLC) y pesada (MHC) de miosina (MLC) entre otras (Pette and Staron, 2000).

Las miofibrillas tienen una alta importancia fisiológica debido a que forman las unidades contráctiles básicas, situándose a lo largo del eje longitudinal de las células musculares (Clark et al., 2002). A lo largo de los miofilamentos su estructura se repite periódicamente en unidades denominadas sarcómeros. Los sarcómeros son las unidades funcionales más pequeñas de la fibra muscular, siendo la unidad contráctil básica del músculo esquelético. Cada sarcómero contiene filamentos gruesos y filamentos delgados, formados por proteínas que modulan las interacciones entre estos los dos tipos de filamentos y proteínas de estabilización de la posición de éstos dentro de la célula. El aspecto estriado del músculo esquelético se debe a la disposición de filamentos proteicos gruesos y finos que forman los sarcómeros.

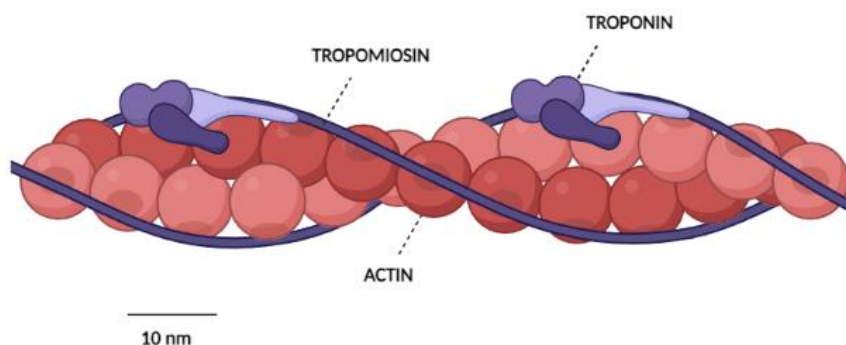


Figura 2. Complejo troponina-tropomiosina-actina

Los filamentos gruesos tienen una longitud de 1.6 μm con un diámetro de 10-12nm, están formados por unas 500 moléculas de miosina compactadas en subunidades enrolladas y proteínas de unión a miosina (MBP), las proteínas C (MBP-C), (MBP-H) y M (MBP-M). La miosina tiene una zona lineal alargada o cola, que permite la unión a otras moléculas de miosina, una zona de cuello y un extremo con dos dominios globulares o cabeza que protruyen del filamento formado por la aposición de múltiples moléculas de miosina. La cabeza contiene dominios de unión a la actina de los filamentos delgados y un sitio de unión a ATP, formando así el “puente cruzado” permitiendo que se dé el proceso de la contracción (Ohtsuki et al. 1986) (Epstein and Fischmxan, 1991). La cabeza de miosina contiene dos cadenas pesadas (MHC) y dos pares de cadenas ligeras (MLC). Las cadenas

pesadas y ligeras están codificadas por familias multigénicas y comprenden varias isoformas. Las dos cadenas pesadas de miosina se entrelazan en el carboxilo terminal formando una “bobina” en espiral (Pette et al.,1980). Las cuatro cadenas ligeras de miosina están asociadas con las dos cabezas de miosina. Estas cadenas se dividen en un par de cadenas ligeras fosforilables y un par de cadenas ligeras alcalinas. Una subunidad de cadena ligera alcalina y una subunidad de cadena ligera fosforilable están asociadas con la región de cabeza de cada cadena pesada de miosina (Matsuda 1983) (Figura 4).

Los filamentos delgados poseen una longitud de 1 μm y un diámetro entre 5-6nm. Están formados por cuatro proteínas: actina F, tropomiosina, troponina y nebulina. La actina F es una doble hebra enrollada en hélice. Cada hebra está formada por moléculas globulares individuales de actina-G; cada actina-G contiene un sitio de unión a los filamentos gruesos. Dos isoformas de la α -actina, α -actinina-2 y α -actinina-3, son los principales componentes estructurales de la línea Z sarcomérica en el músculo esquelético de los mamíferos. La nebulina se extiende a lo largo del filamento delgado como un único polipéptido desde el disco Z hasta el extremo libre del filamento delgado (Swartz et al.,2006; Gunning et al.,2008; Pappas et al., 2011; Ottenheijm et al.,2010; Wang and Wright, 1988).

Los principales componentes de los filamentos delgados y pieza angular del proceso de la contracción son troponina y tropomiosina. La troponina es un complejo compuesto de tres subunidades siendo TnC, la subunidad de unión a Ca^{2+} ; TnI, la subunidad inhibidora; y TnT, la subunidad de unión a tropomiosina (Greaser et al., 1971; Greaser and Gergely, 1973; Greaser, 1971; Funchs, 1968; Ebashi, 1972; Ebashi et al., 1971). La tropomiosina también es una molécula de tres subunidades de unión; una subunidad, la cual forma con troponina un complejo que evita la interacción actina-miosina en condiciones de reposo; una segunda subunidad, la cual se une a actina-G; y por último, una tercera subunidad teniendo un receptor que une el ion calcio el cual está vacío en condiciones de reposo. Para que se dé el proceso de la contracción el complejo formado por troponina-tropomiosina debe cambiar de posición; este cambio es posible cuando se da la unión de Ca^{2+} al complejo exponiendo así los sitios activos de la actina-F. Cada dímero de tropomiosina abarca siete monómeros de actina, y cada complejo de troponina está asociado con una repetición de siete actinas (Domínguez et al., 2011; Swartz et al.,2006; Gunning et al.,2008; Schiaffino and Reggiani, 1996; Exeter and Connell, 2010) (Figura 2).

La estriación que caracteriza al músculo esquelético se forma alternando bandas A (anisotrópicas) y bandas I (isotrópicas). Las bandas A están formadas por filamentos gruesos localizados en el centro del sarcómero y porciones de filamentos delgados. En estas bandas pueden diferenciarse distintas partes; la línea M, es la zona central de cada filamento grueso y zona H, contiene únicamente filamentos gruesos y es identificable sarcómeros en reposo. Las bandas I se extiende desde una banda A de un sarcómero hasta la banda A del siguiente sarcómero. Estas bandas contienen filamentos delgados, pero no filamentos gruesos con líneas Z marcando los límites de los sarcómeros. La línea Z entrecruza los filamentos de actina antiparalelos en una disposición lateral regular y conecta sarcómeros repetitivos en la disposición lineal de la miofibrilla; están formadas por proteínas llamadas conectinas las cuales conectan entre sí filamentos delgados de sarcómeros adyacentes (Wang and Wright, 1988; Exeter and Connell,2010) (Figura 3).

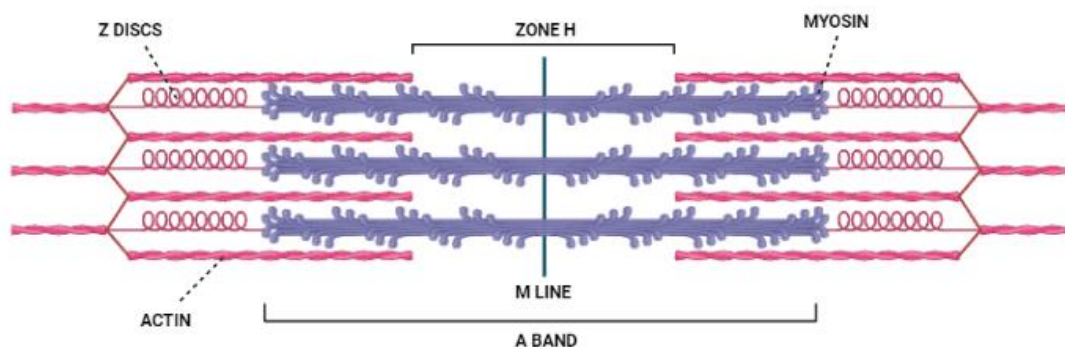


Figura 3. Esquema de la organización de los sarcómeros en el músculo esquelético.

Existen otras proteínas como las titinas, las cuales se extienden desde los extremos de los filamentos gruesos a los sitios de unión en la línea Z ayudando a soportar la tensión frente a un estiramiento del músculo (Ottenheijm et al.,2010).

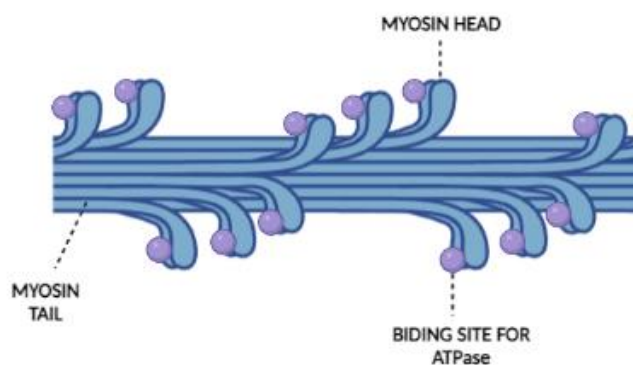


Figura 4. Estructura de la miosina.

Mecanismo de contracción del músculo esquelético. Acoplamiento excitación-contracción

La contracción es posible gracias a la interacción entre las cabezas de miosina de los filamentos gruesos y moléculas de actina de los filamentos finos. Este proceso de unión se repite cíclicamente mientras se desliza el filamento de actina a lo largo del filamento de miosina, un mecanismo que se conoce como 'deslizamiento de los miofilamentos' o 'ciclo de los puentes cruzados'.

En condiciones de reposo el complejo de troponina-tropomiosina evita la contracción al entrelazarse alrededor de la actina y evitar que se una a los puntos de unión de las cabezas de miosina del filamento grueso, situado muy cerca de los filamentos finos de actina. Cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} del citosol se une a la troponina del complejo y produce un cambio conformacional que expone los puntos de unión para

miosina presentes en las moléculas de actina, lo que permite la unión actina-miosina (Gunning et al., 2008) (Figura 5).

Además de incrementos en la concentración de Ca^{2+} , para que la contracción se pueda llevar a cabo es necesario ATP. Una vez unidas actina y miosina, aumenta la actividad ATPasa del dominio de unión de la cabeza de miosina. En presencia de ATP este dominio lo hidroliza en $\text{ADP} + \text{Pi}$ y la energía química del enlace del ATP produce una flexión en la zona del cuello de la molécula de miosina, forzando el deslizamiento de los filamentos. A continuación, hay una momentánea separación de la unión actina-miosina, que volverán a unirse y repetir el ciclo mientras las concentraciones de Ca^{2+} y ATP sean las adecuadas.

Para volver al estado basal basta con que disminuya la concentración citosólica de Ca^{2+} . El principal factor en esta disminución en el músculo esquelético es la bomba de Ca^{2+} con actividad ATPasa localizada en la membrana del retículo sarcoplásmico o SERCA (será tratada más adelante). Al acumular Ca^{2+} en el retículo, la SERCA reduce la concentración de Ca^{2+} del citosol, lo que permite que el complejo troponina-tropomiosina recupere su conformación inicial, impidiendo la formación de nuevos enlaces actina-miosina (Gordon et al., 2000; Gunning et al., 2008).

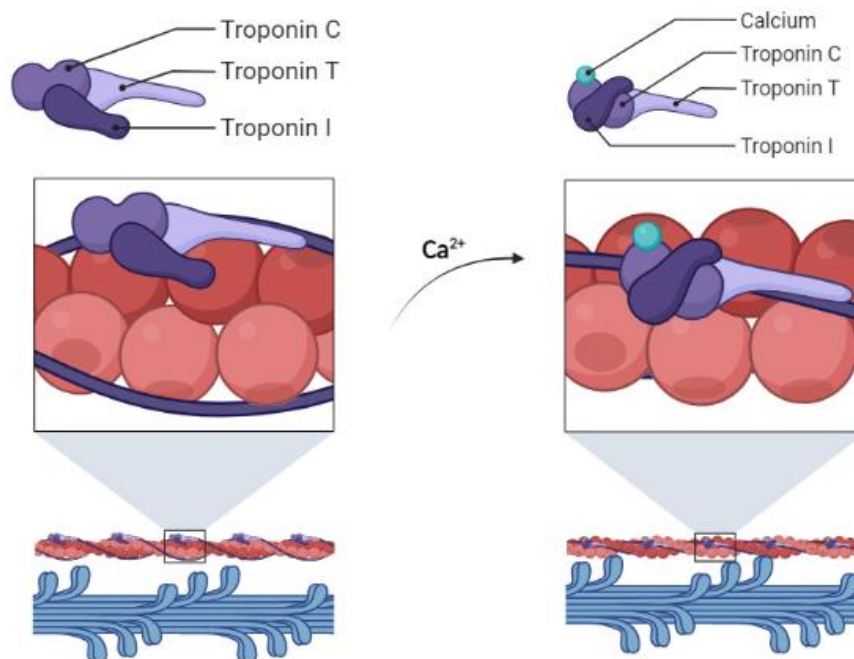


Figura 5. Mecanismo de contracción muscular a través del complejo troponina-tropomiosina-actina.

Acoplamiento excitación-contracción

Cuando el músculo esquelético es activado por su motoneurona el sarcolema sufre una despolarización (excitación) que provoca, mediante mecanismos moleculares una contracción. La contracción es por tanto directamente dependiente de la excitación. Entendemos como acoplamiento excitación-contracción como la secuencia de eventos

que ocurren desde la generación de un potencial de acción en respuesta a un estímulo hasta la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) y la consiguiente contracción muscular.

El sitio del acoplamiento electroquímico-mecánico es la tríada del músculo esquelético donde dos sistemas de membrana, los túbulos T del sarcolema y expansiones del retículo sarcoplásmico intracelular, entran en contacto (Sandow, 1952). En las tríadas un segmento de túbulos T se encuentra muy cercano a cisternas del retículo. En la membrana de los túbulos T se encuentran los receptores de dihidropiridinas (DHPR) o canales de calcio dependientes de voltaje ($\text{Ca}_{v1.1}$), los cuales actúan como sensor de voltaje cuando el potencial de acción alcanza esa zona del sarcolema. Esta despolarización produce un cambio conformacional y la activación de estos canales (Ríos and Pizarro, 1991; Sánchez et al.,1978; Stanfield, 1977). Los $\text{Ca}_{v1.1}$ activados interactúan con los receptores de rianodina tipo 1 (RyR1) localizados en la cisterna terminal del retículo. Esta proteína es un canal de Ca^{2+} que, al abrirse, libera el Ca^{2+} contenido en el RS, incrementando así la concentración citosólica de Ca^{2+} . La señal se origina en la subunidad α_{1S} de $\text{Ca}_{v1.1}$ y se transmite al dominio citoplasmático de RyR1 (Franzini-Amstrong, 1994; Berchtold, 2000; Ríos and Pizarro, 1991). En condiciones normales, los RyR1 acoplados $\text{Ca}_{v1.1}$ están apagados/bloqueados debido a la inhibición que ejerce $\text{Ca}_{v1.1}$ sobre receptor (Zhou et al.,2006). Cuando se activa el sensor de voltaje durante la despolarización desaparece ese bloqueo y se abre el canal RyR1. (Melzer et al., 1984).

Los canales RyR1/ Ca^{2+} del músculo esquelético pueden también activados por elevadas concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Meissner et al.,1986; Smith et al.,1986). Alternativamente, la interacción funcional entre $\text{Ca}_{v1.1}$ y RyR1 podría estar mediada por proteínas de la tríada accesoria. Existe una subunidad auxiliar $\text{Cav}\beta 1a$, que al igual que la subunidad central $\text{Ca}_{v1.1\alpha 1S}$ y RyR1, es esencial para la función del músculo esquelético. Existen evidencias de una proteína adaptadora STAC3 (Sh3 y dominio 3 rico en cisteína) la cual ha sido identificada como una proteína de acoplamiento EC esencial adicional expresándose únicamente en los músculos esqueléticos. Esta proteína se encuentra ubicada junto con $\text{DHPR}_{\alpha 1}$ y RyR1 en las tríadas musculares; la inactivación de STAC3 provocaría una pérdida del acoplamiento o un déficit en la funcionalidad (Horstick et al.,2013) (Figura 6).

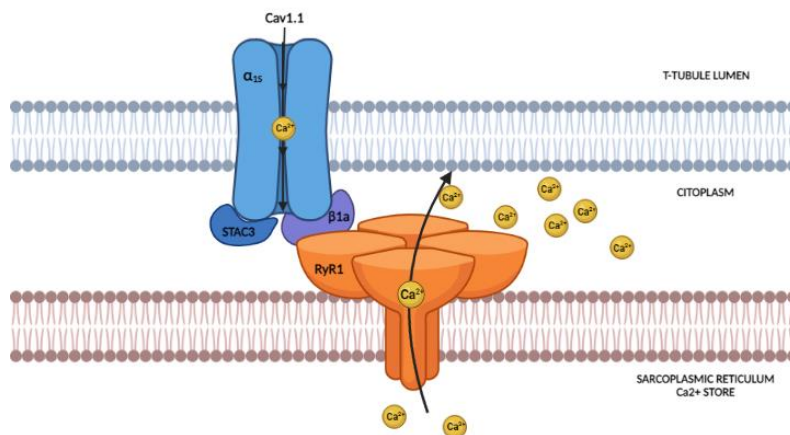


Figura 6. Mecanismo de excitación-contracción. Interacción $\text{Ca}_{v1.1}$ - RyR

Aunque la entrada de Ca^{2+} a través de $\text{Ca}_{v1.1}$ no es necesariamente obligatoria para la liberación de este ion a través de RyR1 durante la despolarización de la fibra muscular, el canal $\text{Ca}_{v1.1}$ es considerado como el principal ligando capacitado para activar la apertura de RyR1 y, por tanto, controlar la liberación de Ca^{2+} del SR en las fibras musculares esqueléticas (Chiarandini et al., 1980; Serysheva et al., 2005).

Además de la activación de los canales RyR1 el acoplamiento mecánico entre $\text{Ca}_{v1.1}$ y RyR1 en el músculo esquelético responde a un modelo de interacción bidireccional; $\text{Ca}_{v1.1}$ controla la liberación de Ca^{2+} del SR mediada por RyR1 (acoplamiento ortógrado) como los canales de RyR1, influyen en las propiedades conductoras de Ca^{2+} de $\text{Ca}_{v1.1}$ (acoplamiento retrógrado) (Nakai et al., 1996).

El Ca^{2+} liberado del RS debe ser recapturado para que las concentraciones de Ca^{2+} citosólico se reduzcan hasta niveles previos a la contracción muscular. Para esto a) los iones Ca^{2+} son tamponados por proteínas citosólicas, b) es transportado en contra de gradiente de concentración al interior del retículo por la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA) (Berchtold, 2000) y c) es transportado al exterior celular por la ATPasa de la membrana plasmática (PMCA). Esta reducción de los niveles de Ca^{2+} citosólicos provoca una relajación del músculo, siendo capaz de responder frente a otro estímulo.

Receptores estimulantes en el músculo

Receptores colinérgicos

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que regula la actividad tanto de las células excitables como no excitables inervadas por el sistema nervioso autónomo y somático, siendo también el principal neurotransmisor del sistema nervioso central (SNC). La ACh está implicada en modular una gran diversidad de actividades fisiológicas entre las que se encuentra la contracción muscular o la secreción. Este neurotransmisor se libera por exocitosis desde vesículas contenidas en las terminaciones nerviosas y se une a receptores denominados colinérgicos.

Existen dos familias de receptores colinérgicos: los receptores nicotínicos y los receptores muscarínicos. Estos tipos no están estructuralmente relacionados puesto que forman parte de superfamilias de receptores independientes. Los receptores nicotínicos (nAChR) pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por receptores, siendo proteínas de membrana pentaméricas que forman canales catiónicos no selectivos. Por el contrario, los receptores muscarínicos (mAChR) pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (proteínas reguladoras de unión a GTP), proteínas de membrana que constan de dos a cuatro unidades hidrofóbicas compartiendo homología entre éstas (Hosey, 1992).

Receptores colinérgicos nicotínicos

Los receptores nicotínicos son proteínas de múltiples subunidades. Los nAChR están altamente descritos al ser la primera familia de receptores de neurotransmisores purificada. El nombre de este receptor deriva de su afinidad por la nicotina teniendo función tanto de unión a ligando como de canal iónico (Bonner, 1989). Estos receptores se caracterizan por tener una secuencia conservada que contiene un par de cisteínas separadas por trece residuos unidos entre sí por un puente disulfuro (receptores Cys-loop).

Los nAChR pueden dividirse en dos grupos: receptores musculares, localizados en la unión neuromuscular esquelética mediando la transmisión neuromuscular; y receptores neuronales, que se encuentran en el sistema nervioso central y periférico. Los nAChR musculares están formados por cinco subunidades dispuestas alrededor del poro iónico (Mishina et al. 1986; Bonner, 1989), y son los responsables de la excitación de las fibras musculares en respuesta a las motoneuronas.

Cada subunidad de nAChR está compuesto por un grupo N-terminal extracelular que interviene en la formación del dominio de unión al ligando, por regiones transmembrana formadas por cuatro secciones hidrofóbicas que atraviesan la membrana (M1, M2, M3 y M4) y por un bucle intracelular entre M3 y M4 que contiene secuencias de consenso de los sitios de fosforilación (Middleton and Cohen, 1991; Unwin, 1992)

La activación de este receptor se produce en dos fases distintas. La primera fase comprende la unión rápida de las moléculas agonistas seguida por una fase, relativamente lenta, donde se da una isomerización del canal al estado abierto (Anderson and Stevens, 1973; Bonner, 1989). Posteriormente, estos canales se bloquean después de la unión de ACh a los sitios de unión específicos, contenidos en el mismo complejo macromolecular que el canal iónico de la membrana. Este canal presenta un umbral de saturación de forma que; cuando se ve expuesto a una concentración de ACh constante sufren un proceso de desensibilización (Steinbach, 1989).

Los receptores nicotínicos sufren modificaciones covalentes postraduccionales incluyendo glicosilaciones y fosforilaciones (Middleton et al., 1988). Se ha demostrado que la fosforilación del receptor aumenta la tasa de desensibilización del nAChR, sobre todo en el nAChR muscular. Por tanto, las modificaciones postraduccionales pueden alterar la función de nAChR. (Steinbach, 1987).

Receptores purinérgicos

Los nucleótidos y nucleósidos de purina son una importante familia de señales intercelulares en diversos tipos celulares, incluyendo tejidos excitables (Drury and Szent-Györgyi, 1929). Sus efectos están mediados por receptores de membrana denominados receptores purinérgicos. Los efectos fisiológicos de esta vía de señalización dependen de la liberación de estos nucleótidos extracelulares (Erlinge and Burnstock, 2008; Burnstock, 1978). Estos receptores se encuentran en el músculo esquelético tanto lumial como intersticialmente (Wang et al., 2002).

El concepto de neurotransmisión purinérgica se estableció al demostrar que la adenosina 5'-trifosfato (ATP) era un transmisor en los nervios inhibidores no adrenérgicos y no colinérgicos, actuando como una señal extracelular. Está involucrado en varios procesos reguladores como la proliferación celular, diferenciación, contracción muscular y comunicación neuronal. Esta señalización purinérgica participa en la secreción endocrina y exocrina, respuestas inmunitarias e inflamación (Burnstock, 2018; Burnstock 1972; Burnstock, 1997).

Los receptores purinérgicos fueron descritos por primera vez en 1976, no siendo hasta 1978 cuando se propuso un criterio para distinguir dos tipos principales de receptores purinérgicos: un tipo de receptor selectivo para adenosina (P1) y otro tipo de receptor selectivo para ATP/ADP (P2) (Burnstock, 1976; Burnstock, 1978). Estos receptores P2 constituyen el principal objetivo extracelular del ATP (Ralevic et al., 1998).

Los receptores P2 están ampliamente distribuidos en el organismo y participan en la regulación de múltiples procesos fisiológicos, siendo de gran interés en los sistemas inmunológico, inflamatorio, cardiovascular, muscular y nervioso central y periférico (Surprenant et al., 2009; Abbracchio et al., 2006). Se encuentran implicados en el control, a largo plazo, de la proliferación y diferenciación, al igual que de la migración celular entre otros procesos (Erlinge and Burnstock, 2008).

Posteriormente surgió una clasificación farmacológica que distingue dos tipos de receptor P2, P2X y P2Y (Burnstock and Kennedy, 1985). La estimulación de ambos promueve la entrada de Ca^{2+} y activa la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP) en varios tipos de células (Harden, 1995; Ralevic et al., 1998). Por lo tanto el ATP extracelular puede mediar su respuesta a través de estos dos tipos de receptores P2.

La familia de receptores P2X está formada por siete subtipos de receptores ionotropos (P2X1 a P2X7) de canales iónicos controlados por ligandos, los cuales ofrecen una permeabilidad rápida (10 ms) a los cationes (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), encontrándose distribuidos por el sistema nervioso, sistema vascular, sistema pulmonar, digestivo y esquelético (Bean, 1992; Dubyak and El-Moatassim, 1993; Jacobson et al., 2010). Participa en la neurotransmisión excitatoria en sistemas nerviosos central y periférico. Cada subunidad del receptor P2X tiene dos dominios transmembranosos (TM1 y TM2), con extremos N y C intracelulares (Bean, 1992; Dubyak and El-Moatassim, 1993).

A familia de los receptores P2Y se compone de ocho subtipos de receptores acoplados a proteínas G (Abbracchio and Burnstock 1994; Erlinge and Burnstock, 2008; Burnstock and Kennedy, 1985) y por tanto metabotropos. Estos receptores activan principalmente la fosfolipasa C (PLC), lo que conduce a la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y la movilización de Ca^{2+} intracelular.

El tiempo de respuesta de los receptores P2Y es más largo que el de las respuestas rápidas mediadas por los receptores P2X, ya que la transmisión de las reacciones del ATP liberado por los nervios simpáticos a los músculos esqueléticos de los receptores P2X (Burnstock, 2007) contrasta con el inicio más lento de la respuesta (100 ms) al ATP de los receptores P2y metabotrópicos (Ralevic et al., 1998) ya que implica sistemas de segundos

mensajeros y/o conductas iónicas mediadas por el acoplamiento a proteínas G (Abbracchio et al., 1994).

SEÑALES DE CALCIO Y HOMEOSTASIS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Las señales de Ca^{2+} consisten en incrementos de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en respuesta a estímulos endocrinos o nerviosos. El Ca^{2+} tiene un fuerte efecto regulador sobre numerosas proteínas reguladoras (cinasa, fosfatasas, numerosos transportadores y canales iónicos,...), y está regulado de manera muy estrecha en todas las células del organismo ya que un incremento no regulado en su concentración tiene efectos tóxicos sobre las células.

En el medio intracelular el ion Ca^{2+} se encuentra casi en su totalidad unido a proteínas y moléculas orgánicas citosólicas, componentes de la membrana plasmática, y secuestrado en el interior de diversos orgánulos que actúan como depósitos intracelulares. En condiciones de reposo la concentración citosólica de Ca^{2+} se mantiene unas 10000 veces inferior a la concentración extracelular, y unas 1000 veces inferior a la presente en depósitos intracelulares (Berridge, 1999; Allbritton et al., 1992; Meldolesi et al., 1990). Las señales de Ca^{2+} se producen por apertura de canales de la membrana plasmática o de depósitos intracelulares (principalmente el retículo), lo que permite la difusión del ion desde el medio extracelular o del interior del retículo al citosol. Las reservas de Ca^{2+} intracelular son una pieza fundamental de la señalización que promueve diversos eventos cruciales en el músculo esquelético como la formación del músculo, la homeostasis muscular o la regeneración entre otras (Tu et al., 2016).

Sistemas de entrada de calcio en el citosol

Aunque existe una gran variedad de estímulos que aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ todos ellos comparten como mecanismo fundamental la activación de canales de Ca^{2+} que permiten o su entrada desde el espacio extracelular o su liberación desde depósitos intracelulares de Ca^{2+} (principalmente del RS). Cada tipo celular presenta una diversa combinación de canales, intercambiadores o ATPasas, modulando así las diferentes señales de Ca^{2+} en los diferentes procesos fisiológicos (Dutta 2000).

En células musculares esqueléticas la entrada de Ca^{2+} a través del medio extracelular se produce durante eventos que conllevan a una despolarización de la membrana plasmática o por medio de agonistas de los diferentes canales presentes en el músculo específicos como inespecíficos.

VOCC Voltage-Operated Calcium Channels

Los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC) o canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son selectivos para este ion siendo fundamentales y una pieza esencial para múltiples funciones celulares como sistemas de excitación-contracción, excitación-transcripción y liberación de hormonas y transmisores en neuronas y otras células secretoras (Reuter 1983; Tsien et al. 1987).

En células excitables la mayor parte del Ca^{2+} implicado en los procesos citados proviene del medio extracelular y penetra hacia el interior a través de los canales VOCC en respuesta a una despolarización del potencial de acción. La entrada de Ca^{2+} se da de forma rápida, debido al gradiente electroquímico para el ion Ca^{2+} , finalizando esta corriente por cierre del poro con la repolarización de la membrana plasmática. Estos canales sufren una inactivación por alcanzar su umbral de saturación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o por despolarizaciones sostenidas en el tiempo (Nowycky et al., 1985).

Este tipo de canal tiene una estructura compuesta por cuatro dominios de detección de voltaje (VSD) agrupados alrededor de un solo poro de iones y se clasifica en dos grandes grupos en función de sus propiedades electrofisiológicas, sensibilidad a bloqueantes farmacológicos y regulación por el potencial de membrana y receptores (Tsien et al., 1995). El principal criterio es el umbral de activación, que los divide en canales de alto umbral de activación (HVA), que incluye los subtipos tipo L (activación de larga duración), y los tipo N, P/Q y R (estos tres ausentes en músculo esquelético) y los de bajo umbral de activación (LVA), también denominados canales de voltaje tipo T (transitorios) (Catterall et al., 2003; Nowycky et al., 1985; Galizzi et al. 1986).

Los canales tipo L, caracterizados por su activación por despolarizaciones intensas, han sido exhaustamente caracterizados y se inhiben (inactivación) mucho más lentamente que los canales de bajo umbral tipo T y los N, P/Q y R, por lo que su activación es más prolongada (Sunagawa, M. 2010).

Estudios de purificación de canales en músculo esquelético revelaron que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, de ambos tipos, están formados por las subunidades $\alpha 1$, β y γ ; estos análisis de las subunidades mostraron que las subunidades $\alpha 1$ y β son sustratos para la fosforilación de proteínas dependientes de cAMP (Curtis and Catterall, 1985). Se demostró que la expresión de la subunidad $\alpha 1$ es suficiente para producir canales de Ca^{2+} funcionales, pero de bajo nivel de expresión y con una cinética anormal (Perez-Reyes et al 1989).

La caracterización de la subunidad $\alpha 1$ esclareció su importancia. La subunidad $\alpha 1$ de 190 a 250 kDa es la subunidad más grande e incorpora el poro de conducción, el sensor de voltaje y el aparato de activación, y los sitios conocidos de regulación del canal por segundos mensajeros, fármacos y toxinas. Esta subunidad está organizada en cuatro dominios homólogos (I–IV) con seis segmentos transmembrana (S1–S6) en cada uno. Los 4 primeros forman un dominio de detección de voltaje y los S5–S6 forman el poro de conductancia. El bucle citoplasmático entre las repeticiones I y II contiene el sitio de unión para la subunidad β y el C-terminal citoplasmático modula las interacciones proteína-

proteína y la orientación del canal (Walker and De Waard, 1998; Striessnig, 2007; Flucher and Tuluc, 2017; Hofmann et al., 1994).

Han sido demostradas cómo diferentes subunidades $\alpha 1$ definen diferentes subtipos de canal. Se estableció una nomenclatura que divide los VOCC en tres familias relacionadas estructural y funcionalmente (Ca_{v1} , Ca_{v2} y Ca_{v3}) (Ertel et al 2000). Los VOCC tipo L están mediados por la familia Ca_{v1} de subunidades $\alpha 1$ (Hui et al 1991, Snutch et al 1991); a diferencia de los VOCC tipo T que están mediados por los canales Ca_{v3} . Los Ca_{v2} definen a canales tipo P/Q ($Ca_{v2.1}$), tipo N ($Ca_{v2.2}$) y R ($Ca_{v2.3}$) los cuales se expresan y funcionan principalmente en neuronas, prácticamente inexistentes en el músculo esquelético. Participan en la liberación de neurotransmisores, potenciales de acción y señales locales de Ca^{2+} (Catterall et., 2003; Perez-Reyes et al 1998).

Las diferencias estructurales que presentan las tres clases de subunidades $\alpha 1$ dan lugar a diferencias en su regulación. La familia de canales Ca_{v1} está regulada por la fosforilación de proteínas a través de vías de quinasas activadas por segundos mensajeros. Por el contrario, la familia de canales Ca_{v2} está regulada por la unión directa de proteínas SNARE (proteínas sinápticas) y proteínas G. La regulación de la familia de canales Ca_{v3} está mucho menos estudiada que para las familias Ca_{v1} y Ca_{v2} (Catterall, 2000).

La farmacología que presentan estas tres familias de canales (Ca_{v1} , Ca_{v2} y Ca_{v3}) es muy distinta entre ellas. Los canales Ca_{v1} son diana de inhibidores orgánicos de los canales de Ca^{2+} , entre estos inhibidores se encuentran las fenilalquilaminas, bloqueadoras de poros intracelulares; las dihidropiridinas (nifedipina, nitrendipina entre otras), activadoras o inhibidoras de canales ya que se cree que actúan alostéricamente para cambiar el canal hacia el estado abierto o cerrado; y las benzotiazepinas (Hockerman et al., 1997; Sunagawa, M. 2010). La familia de canales de calcio Ca_{v2} es insensible a las dihidropiridinas, pero estos canales se bloquean específicamente por toxinas peptídicas de las arañas y los caracoles marinos (Miljanich and Ramachandran, 1995). Por último, los canales Ca_{v3} son insensibles a los inhibidores citados; estos canales se ven bloqueados por mibefradil, siendo un potente inhibidor de canales tipos T, y NNC-55-0396, es un análogo estructural de mibefradil (Mishra and Hermsmeyer, 1994; Fernández-Morales et al., 2015).

En los complejos de señalización de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se considera que la activación se da cuando los efectores y reguladores de la señal de Ca^{2+} se unen a los dominios intracelulares de los canales de Ca^{2+} para recibir y responder a la señal local. Esta unión de los efectores mejora la actividad de los canales Ca_{v1} y Ca_{v2} . En el músculo esquelético las interacciones existentes de $Ca_{v1.1}$ de la membrana plasmática con el canal liberador de Ca^{2+} sensible a rianodina (RyR) en el RS aumenta notablemente la actividad funcional de los canales $Ca_{v1.1}$. (Nakai et al. 1996a). Otro ejemplo de este evento sería la unión de la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /CaM, siendo un efector de mecanismos reguladores dependientes de Ca^{2+} , a un sitio en el dominio carboxi-terminal de los canales $Ca_{v2.1}$ aumentando su actividad (Jiang et al. 2007).

Estos ejemplos de aumento de la actividad del canal Ca_{v} fruto de la unión de efector-receptor denotan que este mecanismo es capaz de modular la aptitud de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje para mejorar su actividad (Catterall, 2011).

Canales de calcio dependiente de voltaje tipo L

El canal dependiente de voltaje tipo L o complejo del receptor de dihidropiridina (DHPR) se localiza, en músculo esquelético, en la membrana plasmática/sistema tubular transverso y se compone de múltiples subunidades; entre estas encontramos a la subunidad α_1 formadora de poros, una subunidad $\alpha_2 \delta$ extracelular y una subunidad β citoplasmática. Además, en este tipo de músculo, participaría una subunidad más siendo una proteína de membrana integral, la subunidad γ (Catterall, 2011).

El genoma de los mamíferos codifica a través de diez genes las subunidades α_1 y a través de cuatro genes las subunidades $\alpha_1 \delta$ y β . La subunidad α_1 ($Ca_{v1.1}$ en músculo esquelético) es la subunidad de mayor importancia en los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L debido a que desempeña diferentes papeles los cuales denotan la importancia de esta subunidad. Una de las funciones más importantes de esta subunidad en este tipo de canal es como sensor de voltaje para el acoplamiento de excitación-contracción (EC) del músculo esquelético.

$Ca_{v1.1}$ no solo es capaz de facilitar la entrada de Ca^{2+} a través de un canal secundario, si no que el mismo opera como un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje, el cual es responsable de una entrada de Ca^{2+} lenta a través de la membrana del túbulo transverso (T-túbulo) cuando se da una despolarización de la membrana; favoreciendo dicha entrada de Ca^{2+} a la recarga de los depósitos de RS (Ríos and Pizarro, 1991).

Se ha demostrado la importancia de $Ca_{v1.1}$ como sensor en la liberación de ATP a través de inhibidores (nifedipina) y de fibras musculares las cuales no presentan estos canales (disgénicos), siendo ausente dicha liberación de Ca^{2+} (Jorquera et al., 2013; Arias-Calderón et al., 2016, Jaimovich et al., 2000; Cherednichenko et al, 2004; Bannister et al, 2009).

Como se ha citado anteriormente, existe un acoplamiento funcional de $Ca_{v1.1}$ y RyR1 de gran eficiencia por el cual, en respuesta a un potencial de acción, se libera el Ca^{2+} del RS en milisegundos y la activación repetitiva de RyR1 se puede mantener a altas frecuencias dando lugar a contracciones tetánicas (Rome, 2006).

Si hablamos del resto de subunidades que componen a estos canales podemos destacar de las subunidades β su implicación en la orientación de membrana, estas capacitan a los canales con propiedades de activación específicas (Buraei and Yang, 2010; Campiglio and Flucher, 2015). En el músculo esquelético es de gran importancia las subunidades $\alpha_2 \delta$ -1 y γ_1 , debido a que son imprescindibles para el acoplamiento de EC del músculo esquelético, y la subunidad β_1 y γ puesto que son componentes esenciales del aparato de acoplamiento de EC del músculo esquelético (Campiglio and Flucher, 2015; Polster et al., 2016).

Canales de calcio dependiente de voltaje tipo T

Los canales de calcio dependiente de voltaje tipo T se dividen tres determinados por las tres subunidades del canal, $Ca_{v3.1}$ ($\alpha 1G$), $Ca_{v3.1}$ ($\alpha 1H$) y $Ca_{v3.3}$ ($\alpha 1I$) (Perez-Reyes,

2003). Estos canales poseen unas características fisiológicas muy destacables puesto que son transitorios y se activan en condiciones de bajo voltaje por despolarizaciones de membrana por debajo del umbral entre -65 y -50 mV; además presentan una inhibición lenta y baja conductancia (Perez-Reyes, 2003).

Debido a sus propiedades y su expresión generalizada, estos canales controlan funciones clave y desempeñan un papel fundamental en funciones fisiológicas en las que se requiere una entrada de Ca^{2+} de umbral bajo para desencadenar o mantener actividades celulares específicas como actividad celular oscilatoria, liberación de hormonas y neurotransmisores, contracción muscular y procesos de proliferación y diferenciación celular (Carbone et al., 2006; Cueni et al., 2008). A voltajes bajos se ha demostrado que los canales tipo T modulan una corriente de Ca^{2+} interna sostenida, la cual es transportada por canales que no presentan una inactivación completa. Esto destaca la capacidad de estos canales para la regulación de las oscilaciones de Ca^{2+} en condiciones de reposo (Carbone and Lux, 1984).

ROC Receptor Operated-Channels

Los canales operados por receptor (ROC) son canales de membrana en los cuales receptor y canal están asociados formando una única entidad molecular. Esta unión ligando-receptor induce cambios conformacionales internos cuyo resultado es la apertura del canal iónico. La apertura del canal es independiente a los cambios del potencial de membrana, siendo el primer canal conocido independiente a una despolarización para promover una entrada de Ca^{2+} (Somlyo and Somlyo, 1968).

Existen diversas hormonas y neurotransmisores capaces de activar conductancias catiónicas no selectivas tras unirse al receptor de membrana. Un ejemplo clásico es la Ach, que actúa a través de los receptores colinérgicos nicotínicos activando una corriente catiónica (IAch). Otro canal clásico y extensamente conocido, altamente presente en el músculo, es el canal purinérgico P_2x siendo su ligando adenosina trifosfato (ATP) (Suzuki, 1985; Brake et al., 1994). La aplicación externa de ATP a receptores P_2x de la membrana plasmática induce la activación de una corriente catiónica no selectiva que produce un aumento del Ca^{2+} intracelular (McFadzean et al., 2002).

SOCC Store-Operated Calcium Channels

El vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} activa una vía de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, proceso denominado entrada de Ca^{2+} operada por depósitos o entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE), siendo de gran importancia en procesos como proliferación, migración, transcripción de genes y contracción muscular (Pan et al., 2014). Este mecanismo se encuentra regulado por el estado de los depósitos intracelulares (Villalobos et al., 1995). Desde que este mecanismo fuese postulado por primera vez por Putney en 1986 en células no excitables (Putney, 1986), su presencia se ha extendido también a tejidos excitables como el músculo esquelético (Darbellay et al., 2008; Weigl et al., 2003)

ICRAC fue la primera corriente de Ca^{2+} operada por almacenamiento descrita para la CCE en respuesta al vaciamiento de reservas de Ca^{2+} (Hoth, 1992). El descubrimiento de la familia TRPC (*transient receptor potential*) fue un avance significativo en la comprensión de este mecanismo, siendo el candidato inicial a canal de entrada durante la CCE. Este primer modelo proponía la existencia de acoplamiento conformacional entre los receptores de IP_3 de los depósitos y los TRPCs de la membrana plasmática que resultaría en la activación de los últimos (Boulay et al., 1999; Selinger et al., 1993; Rosado et al., 2002; Zhu et al., 1996). Posteriormente se descubrió que la proteína Stim1 (proteína de interacción estromal 1) del RS actúa como sensor del contenido de Ca^{2+} de los depósitos, y se identificó que los canales activados por ella son las proteínas Orai1 (Liou et al., 2005; Zhang et al., 2005; Baba et al., 2006; Feske et al., 2006). STIM1 es una proteína de, aproximadamente, unos 75 kDa. Esta proteína de unión a Ca^{2+} localizada en la membrana del RS con una región transmembrana simple y un dominio EF-hand en el extremo amino situado en el lumen del RE (Liou et al., 2005). STIM1 se acumula en las cisternas terminales del SR encontrándose localizado cerca de Orai1. Esta localización inicial de STIM1 explicaría la cinética rápida de activación de SOCE. Cuando existe una disminución o agotamiento de Ca^{2+} en el RS se da una disociación de Ca^{2+} del motivo de mano EF que opera como sensor en la estructura de STIM1. Posteriormente STIM1 se oligomeriza y transloca y acumula en pequeños aglomerados o “punctae” de la membrana, que consisten en uniones ER/membrana plasmática cercanas; esto conlleva a la activación de Orai1 y, por consiguiente, la entrada de Ca^{2+} a través de este canal (Figura 8) (Lilliu et al., 2021; Zhang et al., 2005; Hogan et al., 2010). Existen múltiples evidencias que indican que la oligomerización de STIM1 es el interruptor que controla SOCE (Luik et al., 2008).

Se ha identificado a Orai1 como la proteína responsable de la corriente ICRAC (Vig et al., 2017), formando canales iónicos multiméricos activados por STIM1 y otras proteínas (Vig et al., 2017).

La entrada capacitativa es de suma importancia para la reposición de Ca^{2+} del RS con el fin de mantener unas $[\text{Ca}^{2+}]$ para un rendimiento muscular óptimo (Sztretye et al., 2017). Cabe destacar la dependencia directa de la depleción de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares del retículo sarcoplásmico por parte de este mecanismo; esta reducción de la concentración de Ca^{2+} en la luz del retículo induce la activación de SOCE permitiendo que el Ca^{2+} extracelular atraviese la membrana plasmática, lo que finalmente vuelve a llenar los reservorios de Ca^{2+} RS (Liou et al., 2005; Gach et al., 2008; Cherednichenko et al., 2004; Lilliu, 2021).

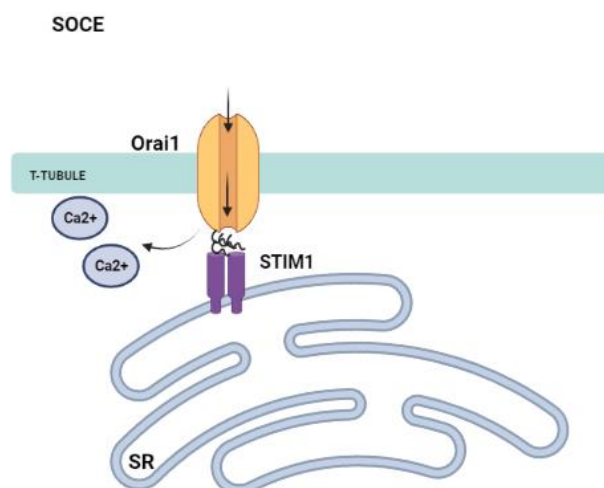


Figura 8. SOCE (store-operated calcium entry). Complejo Orai1-STIM1

Entrada de calcio acoplada a excitación (ECCE)

Otro mecanismo que describe una vía alternativa de entrada de Ca^{2+} extracelular es la entrada de calcio acoplada a la excitación (ECCE). Esta entrada se genera por la despolarización prolongada de la membrana o estimulación eléctrica repetida de baja frecuencia del músculo esquelético. Esta vía de entrada de Ca^{2+} difiere con SOCE en que no requiere el agotamiento en los reservorios intracelulares de Ca^{2+} ni la participación del complejo Orai1/ STIM1 (Cherednichenko *et al.*, 2004; Hurne *et al.*, 2005; Gach *et al.*, 2008).

Cherednichenko y cols. en 2004 describieron inicialmente ECCE como la extinción de la fluorescencia de Fura2 mediante la entrada de iones de manganeso a los miotubos esqueléticos después de ser estimulados eléctricamente o despolarizados por potasio. Este modelo explica como el canal $\text{Ca}_{v1.1}$ detectaría la despolarización de la membrana plasmática en respuesta a estímulos fisiológicos y activaría mediante cambios conformacionales tanto un canal de entrada de Ca^{2+} extracelular, para el que ha propuesto la panexina 1 (*panx-1*), como los receptores RyR1 , que al liberar calcio del RS activaría la (Cherednichenko *et al.* 2004; Lyfenko & Dirksen, 2008). Por tanto, como demuestra Dirksen *et al.*, 2009, la entrada de Ca^{2+} extracelular surge de dos rutas moleculares diferentes; una ruta accionada por depleción de los depósitos (SOCE) y otra acoplada a excitación (ECCE) ambas accionadas a través de la membrana del túbulo t (Figura 9).

Existen evidencias de la presencia de ECCE en presencia de $\text{Ca}_{v1.1}$ mutado, es decir, sin tener la capacidad de permear Ca^{2+} al interior; por lo tanto, la ECCE no implicaba la entrada de Ca^{2+} a través de $\text{Ca}_{v1.1}$ y, sin embargo, depende de la presencia de Cav1.1 (Cherednichenko *et al.*, 2004).

Se ha descrito que los canales de panexina (*panx*) poseen más de un estado de conductancia (Wang *et al.*, 2015, Kollcaku, 2022) permitiendo un alto estado de conductancia el paso de aniones de gran tamaño como ATP y cationes como Ca^{2+} (Kollcaku,

2022). Descifrar el papel de la ECCE en el músculo esquelético podría permitir una mejor comprensión de los distintos mecanismos del acoplamiento excitación-contracción asociados a los cambios del potencial de membrana en las fibras musculares.

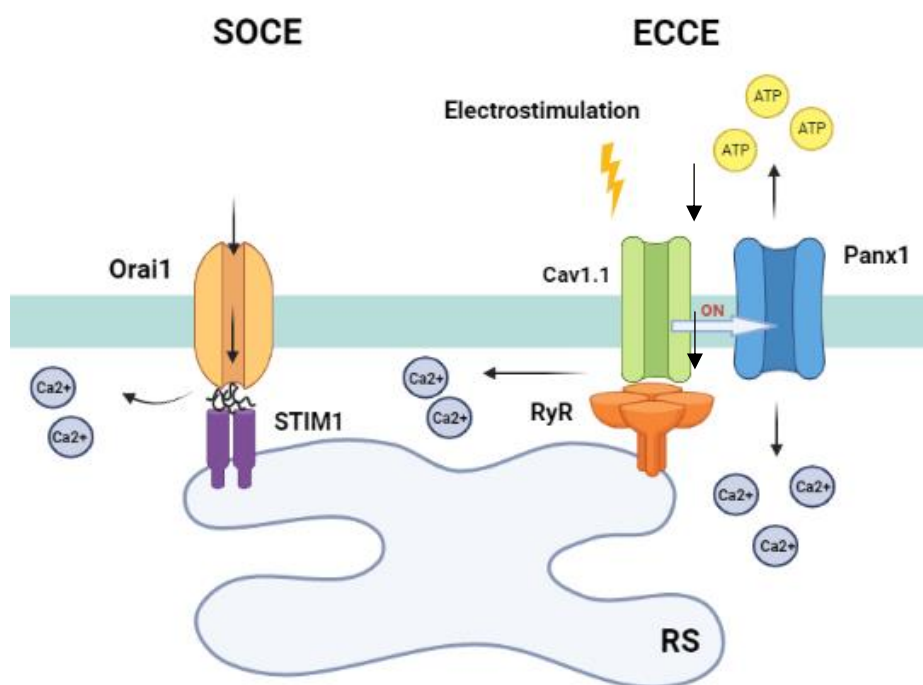


Figura 9. Mecanismos de entrada de calcio celular. SOCE- ECCE.

Receptor de rianodina (RyR)

La liberación de Ca^{2+} desde el interior del RS es un proceso muy importante en muchas vías de señalización, como hemos citado anteriormente, como el acoplamiento excitación-contracción (EC).

El receptor de rianodina se localiza en la membrana del retículo sarcoplásmico teniendo como función la liberación de Ca^{2+} desde este orgánulo; este Ca^{2+} es responsable de funciones celulares como la contracción muscular o la transcripción en el músculo esquelético. Está formado por cuatro subunidades de aproximadamente 565 kDa que forman un único poro transmembrana central (homotetrámero) y un ensamblaje citoplasmático cerrando la brecha entre el RS y los túbulos transversos T. (Coronado et al., 1994; Block et al., 1988).

Este receptor se denomina de rianodina puesto que la unión de este alcaloide inhibe la liberación de Ca^{2+} del SR al unirse con alta afinidad a RyR (Fleischer et al., 1985; Lai et al., 1989). Diversos estudios abordaron esclarecer cual era el sitio de unión de este alcaloide al receptor; debido a que el efecto que este alcaloide genera sobre el músculo esquelético depende de la dosis aplicada de rianodina, se comprobó que a dosis bajas de rianodina (10 nM) aumentan la frecuencia de aperturas de un solo canal RyR al

nivel de conductancia normal (Buck et al.,1992); dosis intermedias de rianodina (1 M) inducen la acción clásica de la rianodina (Buck et al.,1992; Rousseau et al., 1987; Smith et al., 1988) y a altas dosis de rianodina (100 M) bloquean el canal en una configuración cerrada (Zimanyi et al., 1992). Al comprobar que la unión de la rianodina altera la conductancia de un solo canal se demostró que la rianodina se une cerca del poro del canal, corroborando experimentalmente la unión de rianodina en la región de la proteína RyR que se cree que contiene los determinantes estructurales del poro. Este receptor presenta dos ligandos endógenos, en ausencia de rianodina, siendo el propio Ca^{2+} y cADP-ribosa en algunos tipos celulares (Coronado et al., 1994; Ehrlich et al., 1994).

Los RyR pertenecen a una familia de canales de liberación de Ca^{2+} altamente conservada evolutivamente. Se han descrito tres isoformas de RyR codificadas por tres genes distintos (RyR1, RyR2, RyR3), siendo la isoforma RyR1 la implicada en la contracción muscular del músculo esquelético debido a su proximidad a los túbulos T y los canales dependientes de voltaje (DHPR) (Wagenknecht, 2002; Franzini–Armstrong et al., 1994). RyR1 se encuentra en el músculo esquelético de contracción rápida, la isoforma RyR2 que se expresa en cerebro y músculo cardíaco, y la isoforma RyR3 que se expresa en músculo liso y cerebro (Marks et al., 1989; Mikami et al., 1989).

El canal de liberación RyR1 es el vínculo que existe entre las señales eléctricas que se generan en el sistema nervioso central y la liberación de Ca^{2+} que activa la maquinaria contráctil para generar un movimiento del muscular. Este canal al estar presente en el músculo esquelético forma un complejo multiproteico que se extiende desde el lumen del RS hasta prácticamente el medio extracelular en invaginaciones de túbulos transversales de la membrana superficial. Este canal, al ser miembro fundamental de la maquinaria del acoplamiento EC, es esencial para el músculo esquelético (Rebbeck et al.,2014; Hernández-Ochoa et al.,2016). Durante este proceso la subunidad $\alpha 1S$ del receptor de dihidropiridina (DHPR o $\text{Ca}_v1.1$) detecta la despolarización de la membrana del túbulo transverso T y la transmite a RyR1 que se abre liberando Ca^{2+} desde el lumen del RS (Horstick et al.,2013).

Receptor de IP_3 (IP_3R)

Como se ha explicado con anterioridad la despolarización de la membrana plasmática, en el músculo esquelético, provoca un aumento rápido de $[\text{Ca}^{2+}]$ fruto de la liberación de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} del receptor de rianodina tipo 1 (RyR1); esto forma parte del proceso de acoplamiento de excitación-contracción (ECC). Pero existe un segundo transitorio de Ca^{2+} el cual es más lento y depende de la activación del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R) ubicado en la membrana de los depósitos internos el cual funciona como un canal controlado por ligando; esto se relaciona con la expresión génica y media el proceso de acoplamiento de excitación-transcripción (ETC) mecanismo el cual se explicará con detenimiento en los siguientes apartados (Jaimovich et al., 2000; Araya et al., 2003; Bustamante et al., 2014).

En múltiples de tipo celulares, incluido el músculo esquelético, una gran variedad de agonistas se unen a receptores acoplados a proteínas G, estos receptores a su vez

activan a la fosfolipasa C (PLC). La hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato por la PLC genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ regula el Ca²⁺ intracelular movilizando el Ca²⁺ del RS debido a su unión a un receptor situado en el orgánulo (IP₃R), provocando la liberación de Ca²⁺ y el consiguiente aumento de la concentración de Ca²⁺ citosólico y nuclear el cual modula la actividad de varios factores de transcripción para favorecer la transcripción. DAG actúa estimulando la proteína quinasa C (Berridge and Irvine, 1989). Este mecanismo regula una gran variedad de procesos celulares como secreción, contracción o proliferación celular entre otros.

Existen diversas formas de inducir un aumento en la actividad de IP₃R siendo a través de ATP una de ellas. ATP actúa como un cofactor o regulador alostérico, es decir, cuando ATP está a concentraciones menores de 0.5mM en presencia de IP₃ se produce un aumento en la actividad del IP₃R, mientras que a concentraciones mayores de ATP se da una disminución de la actividad de IP₃R debido a que el ATP se une competitivamente al sitio de unión del IP₃ (Thrower et al.,2001). Se ha demostrado como el ion Ca²⁺ también es capaz de inducir una mayor actividad en IP₃R debido a que la presencia de Ca²⁺ potencia la apertura de RyR e IP₃R permitiendo así la interacción entre diferentes vías de liberación de Ca²⁺. La proximidad de los canales provoca que el Ca²⁺ liberado a través de uno de ellos estimule la liberación de Ca²⁺ por parte del otro tipo. Esta interacción podría dar lugar a la generación de ondas de Ca regenerativas (Morales et al., 2005).

Depósitos de calcio intracelular

Para asegurar un mantenimiento de las concentraciones citoplasmáticas de Ca²⁺ y su homeostasis, la célula presenta una serie de compartimentos en los cuales se almacena Ca²⁺ denominados depósitos intracelulares. Como depósito principal y con una mayor capacidad de almacenaje encontramos al retículo sarcoplásmico, pero no es el único, destacando la presencia del aparato de Golgi o gránulos de secreción que contribuyen a esta compartimentalización del Ca²⁺ intracelular. Dentro de estos depósitos existen orgánulos, como la mitocondria, capaces de capturar grandes cantidades de Ca²⁺ durante un periodo de estimulación (Pozzan et al., 1994; Sorrentino et al.,2001).

Retículo sarcoplásmico

Como se ha descrito, la contracción muscular muestra una fuerte dependencia de la [Ca²⁺]_i. Para dicha contracción, una pieza clave en el proceso es el RS siendo el principal orgánulo de almacenamiento y regulador del Ca²⁺ intracelular para procesos de contracción y relajación muscular, siendo capaz de almacenarlo a altas concentraciones (0,5 a 2mM) (Jorgensen et al., 1977).

Aparte de las estructuras especializadas llamadas tríadas (descritas con anterioridad), la mayor parte del RS del músculo existe como por membranas tubulares ramificadas que se expanden por el interior de la célula. Mientras las tríadas son el punto principal de liberación de Ca²⁺ durante la señal celular, esta porción ramificada del RS opera como sistema de recaptación de Ca²⁺ durante el proceso de la relajación muscular, promoviendo la reversión a [Ca²⁺]_i basales. Esta región del RS se conoce como RS longitudinal (LRS) (Franzini-Amstrong et al., 2005).

Existen una serie de proteínas estrechamente relacionadas con el RS e implicadas en modular la liberación de Ca^{2+} desde el interior, la captación de Ca^{2+} desde el citosol y el almacenaje de este. (Michalak and MacLennan, 1980; Jorgensen et al., 1985). Entre estas proteínas se encuentra la calsecuestrina (CSQ) siendo la proteína más abundante en el interior del RS. Esta proteína está localizada en el RS de unión (JRS) pero no anclada, cerca de los canales RyR; siendo una glicoproteína ácida capaz de formar polímeros en respuesta a los incrementos de la concentración de Ca^{2+} (Franzini-Amstrong et al., 2005; Michalak and MacLennan, 1980; Jorgensen et al., 1985; Zhang et al., 1997). Se ha descrito la formación de un complejo multiproteico de esta proteína que, a través de interacciones con las proteínas triadina y junctina (ambas proteínas de anclaje), se asocia a RyR formando las cuatro proteínas un complejo de liberación de Ca^{2+} (Zhang et al., 1997).

La principal función que tiene esta proteína es la unión de Ca^{2+} y el almacenaje de este a concentraciones suficientes como para promover contracciones musculares repetidas (Beard et al., 2004). Cumple también la función de amortiguador de las concentraciones de Ca^{2+} para evitar la precipitación de este en el lumen del RS. La calsecuestrina presenta dos isoformas (Casq1 y Casq2), encontrándose ambas isoformas implicadas en la contracción del músculo esquelético. La Casq1 se encuentra asociada a la contracción rápida y lenta, a diferencia de la Casq2 que solo interviene en la contracción lenta (Beard et al., 2004; Ikemoto et al., 1989; Kawasaki et al., 1994).

La liberación de Ca^{2+} desde el RS a través de RyR es directamente proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]$ del interior del retículo; por tanto, también estaría ligado a esta $[\text{Ca}^{2+}]$ el nivel de activación de RyR. En este aspecto interviene la CSQ, debido a que la respuesta de RyR está modulada por cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ del lumen del RS, siendo esta mayor cuando la CSQ está asociada a la RyR (Ikemoto et al., 1991; Beard et al., 2004; Ikemoto et al., 1989). Destaca como componente fundamental del acoplamiento excitación-contracción y altamente ligada con el RS el receptor de rianodina (RyR) y la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA) descritos en profundidad en apartados posteriores.

El receptor de rianodina (RyR) actúa como canal de liberación de Ca^{2+} des RS; por tanto, es un componente central en el acoplamiento excitación transcripción ya que controla la salida de Ca^{2+} desde el lumen del RS siendo esta salida la que activa y regula la contracción del músculo esquelético (Lehnart et al., 2004).

El RS acumula Ca^{2+} gracias a la presencia de bombas de Ca^{2+} SERCA en su membrana. Esta proteína actúa contra gradiente captando Ca^{2+} del citosol y transportándolo al lumen del RS con el fin de reducir la concentración de Ca^{2+} citosólica promoviendo la relajación muscular y el almacenaje de Ca^{2+} en el RS (MacLennan, 1997).

Se ha demostrado que para transmitir la señal de Ca^{2+} a través de la célula el RS utiliza un proceso regenerativo denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR “ Ca^{2+} induced Ca^{2+} release”) Este proceso CICR opera gracias a la proximidad existente entre los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática y los canales de liberación de Ca^{2+} del RS (RyR) posibilitando que la propia corriente de Ca^{2+} que entra a través de los canales de membrana desde el medio extracelular induzcan la apertura de RyR. Aquí el Ca^{2+} tiene un componente bifásico sobre RyR, ya que cuando aumenta la concentración de este ión se da una retroalimentación positiva mejorando así la apertura de los canales como se ha citado (CICR); pero al alcanzar una concentración umbral se revierte y cambio de

retroalimentación positiva a negativa, dando lugar a la inhibición de este canal desde el RS (Berridge, 1997; Bezprozvanny y Ehrlich, 1995). Por otra parte, al estar próximos los canales de RyR en el RS tiene la capacidad de formar ondas de Ca^{2+} intracelular que transmiten la señal a través de la célula (Berridge, 1997).

Aparato de Golgi

El aparato de Golgi o complejo de Golgi es conocido por ser un orgánulo que contribuye en el procesamiento y distribución de proteínas de membrana y secreción. Otra función para destacar de este orgánulo es el almacenamiento de Ca^{2+} , ya que se estima que puede llegar a almacenar hasta el 5% del total de Ca^{2+} celular superando en concentración (1-2mM) a otras regiones celulares (Chandra et al., 1991).

La captación de Ca^{2+} en este complejo es llevada a cabo por SERCA (Sarco Endoplasmic reticulum calcium ATPase) y SPCA (Secretory pathway Ca^{2+} ATPase); localizándose SERCA en la cara cis del complejo, a diferencia de SPCA que se localiza en la cara trans de este (Lin et al., 1999; Shull, 2000).

Se ha demostrado que las reservas de Ca^{2+} del RS y la vía secretora, compuesta por el aparato de Golgi y otras vesículas implicadas en la secreción, están implicadas en la regulación de funciones celulares. Esto se vería respaldado por la concentración del lumen que presentan estos orgánulos es necesaria para una síntesis proteica óptima, desnaturalización final de proteínas formadas o procesamiento dependiente de chaperonas entre otros procesos (Meldolesi and Pozzan, 1998).

El aparato de Golgi, como el RS, tiene la capacidad de liberar Ca^{2+} de forma rápida inducida por IP_3 . Se han encontrado receptores de IP_3 en el aparato de Golgi por tanto, puede darse una liberación del Ca^{2+} almacenado por el complejo y liberarse tras la estimulación con agonistas acoplados a la producción de IP_3 (Lin et al., 1999; Pinton et al., 1998; Van et al., 2004).

Mitocondrias

La mitocondria es un orgánulo de tamaño y aspecto variables que genera la energía necesaria para la célula mediante la respiración celular y la producción de ATP. Además de esta función participa en la homeostasis del Ca^{2+} celular. Durante las señales de Ca^{2+} las mitocondrias pueden captar Ca^{2+} a favor del fuerte gradiente electroquímico de la membrana interna mitocondrial a través de un transportador selectivo localizado en la membrana interna de la mitocondria (Sanders, 2001). Este aumento del Ca^{2+} en la matriz mitocondrial promueve un aumento en la tasa de síntesis de ATP. Su localización de este orgánulo en lugares de entrada y salida de Ca^{2+} promueve el almacenamiento en su interior (McCarron and Muir, 1999).

Por otra parte, la mitocondria posee una concentración umbral de Ca^{2+} en el lumen a partir de la cual se produce la salida del Ca^{2+} capturado por el orgánulo. Esta salida se puede llevar a cabo mediante antiporters, que sacan Ca^{2+} del lumen movilizándolo H^+ o Na^+ hacia el interior o mediante CICR mitocondrial a través de un poro de transición mitocondrial sensible a Ca^{2+} (Bernardi, 1999).

La señalización del Ca^{2+} mitocondrial y mantenimiento de la homeostasis por parte de este orgánulo es de suma importancia en el control de las funciones celulares fundamentales. La mitocondria se encuentra ubicada en las regiones próximas al RS, dándose la captación de Ca^{2+} mitocondrial cerca de los canales de liberación de Ca^{2+} desde el RS (RyR). Esta proximidad favorece la interacción entre estos orgánulos y, por tanto, una cooperación en el mantenimiento de la homeostasis. El Ca^{2+} acumulado por la mitocondria no viene únicamente de RyR también viene de la captación del Ca^{2+} liberado por IP3R, siendo el 25-50% de la concentración total del lumen mitocondrial (Pacher et al., 1999). Se ha demostrado que el contenido de Ca^{2+} en el lumen mitocondrial aumenta cuando la célula es expuesta al estímulo de agonistas que movilizan el Ca^{2+} y, la captación mitocondrial de Ca^{2+} está estrechamente relacionada con los aumentos en el potencial de membrana debido a activaciones del metabolismo (Hajnóczky et al., 1995; Pacher et al., 2002).

Mecanismos de reducción de la concentración de calcio intracelular

Altas concentraciones de Ca^{2+} intracelular conducen a una muerte celular, por lo que la reducción de la concentración de Ca^{2+} en el citosol es uno de los mecanismos fundamentales de señalización celular (Clapham, 1995; Clapham, 1997). Al ser una molécula que no presenta forma de ser metabolizada, existe una estrecha regulación de los niveles intracelulares a través de proteínas de unión y mecanismos de extrusión (Clapham, 1995; MacLennan, 1997).

Existe una gran inversión de energía por parte de la célula para efectuar cambios en la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) y mantener una concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en reposo del orden de 100nM. Estas concentraciones son mantenidas por sistemas de bombeo de Ca^{2+} los cuales no solo ayudan a esta concentración en reposo, sino que además colaboran en la recuperación de las concentraciones basales tras un estímulo. Estos sistemas se localizan en la membrana plasmática y en la membrana de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares y su actividad aumenta cuando aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]$, y no disminuyen su actividad hasta que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es restablecida (Clapham, 1997; Berridge et al., 1999).

Teniendo en cuenta esto, podemos distinguir dos procesos los cuales engloban diferentes sistemas en función de la dirección hacia la que transportan Ca^{2+} : sistemas de extrusión de calcio hacia el medio extracelular, que incluye la bomba PMCA y el intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, y sistemas de recaptación de Ca^{2+} hacia los depósitos, llevada a cabo por SERCA (Figura 7).

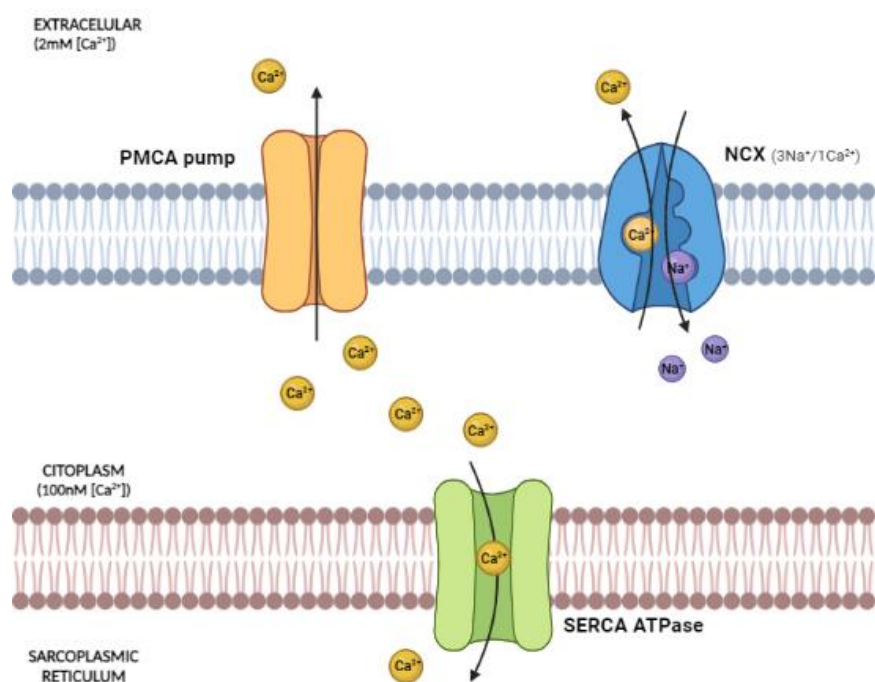


Figura 7. Mecanismos de la reducción de Ca^{2+} intracelular. Bomba PMCA, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y SERCA.

Extrusion de calcio

PMCA Plasma Membrane Calcium ATPase

La bomba PMCA es una cadena polipeptídica de 138kDa (Carafoli et al., 1985). Esta ATPasa es un transportador de Ca^{2+} ubicuo que lo bombea desde el citoplasma a la matriz extracelular e intercambia este ión por 2H^+ , posteriormente expulsados al exterior por intercambiadores H^+/Na^+ de la membrana plasmática. Este proceso llevado a cabo por la PMCA es crucial para mantener bajas las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. Una de sus propiedades a destacar es su estimulación por la calmodulina debido a una interacción directa con esta, incrementando así la afinidad con el ion Ca^{2+} y su velocidad de extrusión. Su papel es menor sobre la regulación del Ca^{2+} citosólico en células excitables, como el músculo esquelético, a diferencia que en otros tipos celulares; por el contrario, existen evidencias de su implicación en la transducción de señales (Strehler and Zacharias, 2001; Mohamed et al., 2010).

La actividad de la PMCA puede verse modulada por cambios en el potencial de membrana de la célula. Despolarizaciones de la membrana estimulan la bomba PMCA, acelerando la salida de Ca^{2+} al medio extracelular; por el contrario, hiperpolarización de esta inhibiría la salida de Ca^{2+} . Se han descrito otras formas de inhibición de la bomba a través de lantano, ortovanadato y MgCl_2 (Zhang et al., 1992; Furukawa et al., 1989).

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) utiliza la energía almacenada del gradiente electroquímico de Na^+ para extrudir Ca^{2+} desde el citosol intercambiándolo por Na^+

siguiendo una estequiometría 3 Na⁺/ 1 Ca²⁺. Destaca este sistema por su capacidad de operar también en el modo reverso, lo que permite la incorporación de Ca²⁺ desde el medio extracelular bajo determinadas condiciones, como son la despolarización de la membrana plasmática y la disminución o la inversión del gradiente de Na⁺.

Este intercambio Na⁺/ Ca²⁺ influye en el potencial de membrana e indirectamente en todos los procesos celulares dependientes de este, al igual que dicho intercambio depende en sí del potencial. Por tanto, este mecanismo permite que cambios en el potencial de membrana modulen la concentración de Ca²⁺ intracelular a través de una ruta distinta a los canales de Ca²⁺ (Eisner and Lederer, 1985; Mullins, 1979).

Se ha demostrado que el intercambiador Na⁺/ Ca²⁺ está implicado en el acoplamiento excitación-contracción debido a su capacidad para operar de manera reversa y mover el Ca²⁺ en ambas direcciones y así, suministrar el Ca²⁺ necesario para activar los canales RyR de manera similar a los canales de voltaje tipo L (Niggli and Lipp., 1993; Lipp et al., 1990).

Recaptación de calcio hacia los depósitos

SERCA Sarco Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase

SERCA es una ATPasa involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de Ca²⁺ bombeando Ca²⁺ al interior del RS. Esta proteína posee un tamaño aproximado de 110 kDa localizada en la membrana del RS longitudinal responsable del transporte de Ca²⁺ desde el citosol hacia el lumen del retículo sarcoplasmático (RS) después de la contracción muscular, facilitando así la relajación del músculo esquelético. En condiciones óptimas se da un transporte 2Ca²⁺ por cada ATP hidrolizado (MacLennan, 1997). SERCA no sólo tiene un papel fundamental en la homeostasis del calcio citosólico, sino también en la regulación del gasto energético celular (Curtis et al., 2013).

La familia de bombas SERCA está codificada por tres genes diferentes, SERCA1, SERCA2 y SERCA3, y siete isoformas diferentes se expresan a partir de estos genes (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). SERCA1 es una isoforma específica del músculo esquelético que se expresa mayoritariamente en músculos de contracción rápida, siendo 1a y 1b formas adultas y neonatales, respectivamente. SERCA2a se expresa principalmente en músculo esquelético de contracción lenta; a diferencia de SERCA 2b que se expresa de forma ubicua en todos los tipos de células en una abundancia baja (MacLennan, 1997; Periasamy and Kalyanasundaram, 2007).

Las SERCA expresadas en el músculo están reguladas por dos miembros de una familia de genes: fosfolambano (PLN) (Tada and Kadoma, 1989; Simmerman, 1998) y Sarcolipina (SLN) (Odermatt et al., 1997; Hellstern, 2001). PLN es una proteína de membrana que interactúa con las moléculas SERCA para reducir su afinidad aparente por el Ca²⁺ e inhibir su actividad a concentraciones bajas, pero no altas, de Ca²⁺ (Tada, 1989; Simmerman, 1998). SLN es una proteína de membrana que se asemeja a PLN en estas características inhibitorias esenciales (Odermatt et al., 1997). Tanto PLN como SLN pueden inhibir tanto SERCA1a como SERCA2a con características similares (Toyofuku, 1992).

Existen una serie de fármacos que inhiben específicamente a la SERCA siendo tapsigargina (TPS) y el ácido ciclopiazónico (Ganitkevich, 1999). La curcumina y la 2,5-di-tert-butilhidroquinona (BHQ) también provocan una inhibición, dando lugar a una conformación de baja afinidad por el Ca^{2+} de la SERCA (Low et al., 1992).

Acoplamiento excitación transcripción

Estímulos externos son convertidos en señales por las células excitables, dando lugar a una amplia variedad de respuestas biológicas. La corriente de Ca^{2+} transportada a través de los canales dependientes de voltaje regula la expresión de diversos genes fruto de una comunicación directa con el núcleo. Este proceso es conocido como acoplamiento excitación-transcripción (ETC). Este evento relaciona la despolarización de las fibras musculares esqueléticas con la activación de la señalización que da lugar a la transcripción de genes de varias vías (metabólica, estructural, endocrina, etc.).

Dicha activación se inicia a través de la detección de voltaje por parte de un sensor de voltaje DHPR ($\text{Ca}_{v1.1}$). Al detectar el estímulo $\text{Ca}_{v1.1}$ actúa como sensor de la panexina tipo 1 (Panx-1), dando lugar a la liberación de ATP a través de Panx-1 desde el interior de la fibra al medio extracelular tras la estimulación eléctrica.

El ATP liberado al medio extracelular se une a los receptores purinérgicos (P_2X y P_2Y); estos receptores activan, a su vez, proteína G, la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la fosfolipasa C (PLC); las cuales favorece la producción del segundo mensajero $\text{Ins}(1,4,5)\text{trifosfato}$ (IP_3). IP_3 se une a $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R}$ (IP_3R), presente tanto en la membrana del retículo sarcoplásmico (SR) como en el núcleo, provocando la liberación de Ca^{2+} desde el SR al medio intracelular. El aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular induce la activación de una cascada de señalización responsable de modular la expresión de genes tempranos inmediatos (*cfos*), genes inducidos por el ejercicio (*IL-6*) o genes relacionados con la plasticidad (*troponina I rápida/lenta*) (Buvinic et al., 2009, Jorquera et al., 2013; Fernandez-Verdejo et al., 2014; Carrasco et al., 2003; Araya et al., 2003; Jaimovich et al., 2000) (Figura 10).

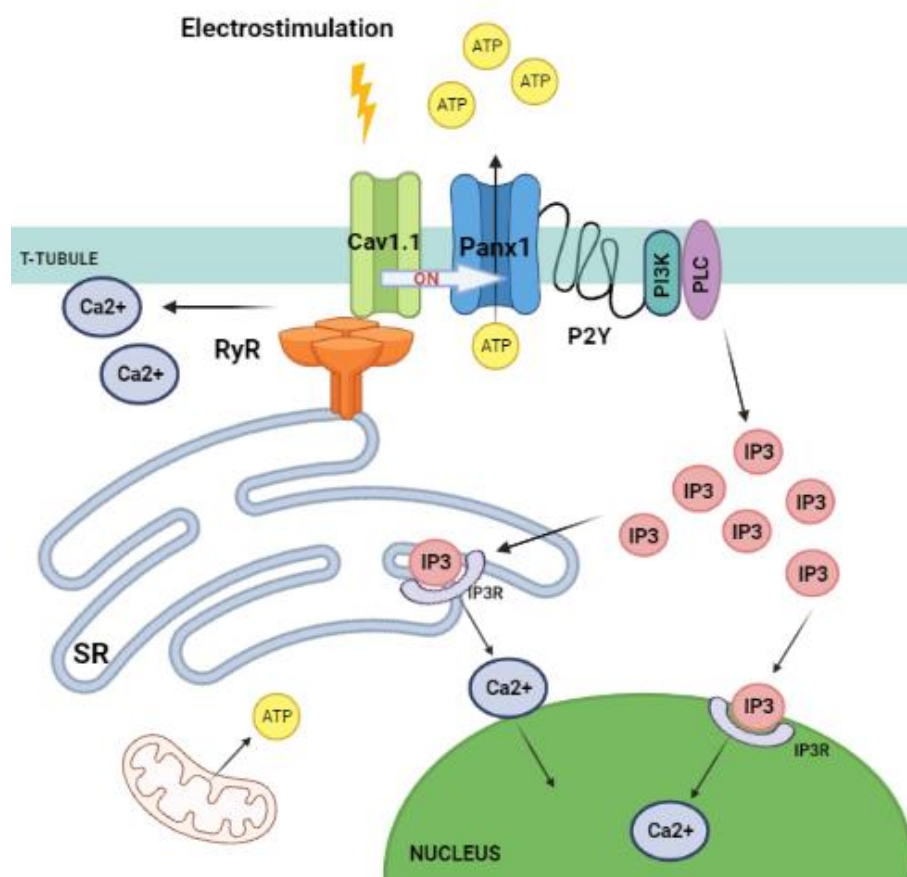


Figura 10. Mecanismo acoplamiento excitación-transcripción (ET)

Ha sido demostrado en los últimos años la participación de $Ca_{v1.1}$ como precursor en la activación de la cascada de señalización relacionada con el acoplamiento excitación-transcripción (ET). Al igual, ATP cumple una función de mediador entre la despolarización de la membrana, la señalización del calcio y la expresión génica, tanto en cultivos primarios de músculo esquelético como en fibras adultas (Arias-Calderón et al., 2016; Buvinic et al., 2009, Jorquera et al., 2013) Existen evidencias de un complejo multiproteico relacionado con el proceso de acoplamiento ET, que alberga el sensor de voltaje DHPR ($Ca_{v1.1}$) y proteínas relacionadas con la liberación de ATP (canal Panx1) y la señalización de ATP extracelular ($P2Y_2$ R) (Bustamante et al., 2014).

Se ha demostrado la importancia de $Ca_{v1.1}$ como sensor en la liberación de ATP a través de inhibidores (nifedipina) y de fibras musculares las cuales no presentan estos canales (disgénicos), siendo ausente dicha liberación de Ca^{2+} (Jorquera et al., 2013; Arias-Calderón et al., 2016, Jaimovich et al., 2000; Cherednichenko et al, 2004; Bannister et al, 2009).

Panx-1

Panx-1 se localiza dentro de la familia de las panexinas, donde encontramos tres proteínas integrales de membrana glicosiladas (Panx-1, Panx-2 y Panx-3) siendo Panx-

1 es el miembro mejor caracterizado con expresión ubicua en diversos órganos y tipos celulares (altos niveles en corazón, músculo esquelético, SNC entre otros) (Bruzzzone et al., 2003; Baranova et al., 2004; Boassa et al., 2008; Peñuela et al., 2009).

Múltiples estudios avalan a Panx-1 como un “hemicanal” de membrana de gran poro y alta conductancia *in vivo* el cual es permeable a la adenosina 5'-trifosfato (ATP) un mediador entre la despolarización de la membrana, la señalización del calcio y la expresión génica, tanto en cultivos primarios esqueléticos como en fibras adultas (Araya et al., 2003, D'hondt et al., 2011, Baranova et al., 2004; Boassa et al., 2008; Locovei et al., 2006).

Aunque existe controversia en torno a las distintas formas en las cuales modula Panx-1; se ha descrito que tanto en la activación como inhibición del canal pueden ocurrir por elevadas concentraciones de K⁺ extracelular (Locovei et al., 2006), ATP (Locovei et al., 2006), altos niveles de Ca²⁺ intracelular (Locovei et al., 2006), estrés mecánico (Bao et al., 2004; Locovei et al., 2006), voltaje (Kurtenbach et al., 2013), regulación redox, óxido nítrico (NO) (Lohman et al., 2012), NMDA (Weilinger et al., 2012), cambio de pH extracelular, interacción con receptores purinérgicos (Bao et al., 2013) y caspasas (Pelegrin and Surprenant, 2006).

Existen evidencias de la participación de Panx-1, debido a su asociación con receptores purinérgicos, en un mecanismo de retroalimentación positiva que permite la liberación de ATP inducida por ATP. Panx-1 es activado por ATP extracelular a través de receptores purinérgicos; tanto los receptores metabotrópicos P₂Y (Locovei et al., 2006b) como el receptor ionotrópico P₂X₇ (Locovei et al., 2007).

Existen evidencias de la presencia de los canales de Panx-1 en el sarcolema y en los túbulos T de fibras musculares esqueléticas; dándose una co-localización en los túbulos T con los canales Ca_{v1.1} siendo posible la interacción y coordinación de estas dos moléculas para desencadenar la liberación de ATP a través de Panx-1 desencadenando la cascada de activación responsable del acoplamiento ET (Buvinic et al., 2009)

MIOCINAS

El estudio del músculo esquelético ha permitido conocer a este tejido más allá de una función asociada a la locomoción. A través de diversos estudios a finales del siglo XX se revelaron para el músculo esquelético funciones endocrinas y autocrinas (Colman, 1975) siendo esta primera visión del músculo base de las investigaciones actuales.

Múltiples publicaciones avalan al músculo como una glándula capaz de producir una serie de sustancias cuando es estimulado. A estas sustancias se las acuñó con el nombre de miocinas (Pedersen et al., 1985); siendo miostatina el primer péptido derivado del músculo que cumplió con los criterios de una miocina y la IL-6 la primera miocina que se descubrió que se secretaba en el torrente sanguíneo en respuesta a las contracciones musculares (Pedersen and Febbraio, 2008). Múltiples evidencias corroboran que el músculo esquelético libera una lista cada vez mayor de mensajeros intercelulares denominados colectivamente miocinas (Pedersen and Febbraio, 2012; Pedersen et al., 2003).

Actualmente conocemos como miocinas a las proteínas liberadas por las células musculares esqueléticas como respuesta a las contracciones. Estas miocinas están implicadas en la regulación autocrina del propio músculo y en la regulación paracrina y endocrina de otros tejidos u órganos (Pedersen and Febbraio, 2012; Pedersen and Febbraio, 2008). Debido a que las miocinas incluyen tanto citocinas de acción local como hormonas canónicas involucradas en una amplia gama de funciones, desde el metabolismo hasta la inmunidad y la inflamación, el campo ha despertado interés debido a sus implicaciones traslacionales (Severinsen et al., 2020; Pedersen et al., 2003). Existe evidencia experimental de que la IL-6 y otras mioquinas pueden explicar los cambios sistémicos presentes en las enfermedades inflamatorias (Bivona et al., 2022).

Como se ha descrito, el músculo esquelético representa el órgano más grande del cuerpo, por tanto, las miocinas están involucradas en procesos de regulación endocrina, paracrina y autocrina, manteniendo una comunicación directa del músculo esquelético con tejidos y órganos diversos, siendo potencialmente significativa la influencia que ejercen sobre el metabolismo (Pedersen, 2011; Carson, 2017).

El mecanismo de la contracción no solo está implicado en la locomoción, también se ha descrito su relación con las miocinas ya que estarían reguladas por la contracción, como es el caso de la interleucina-6 (IL-6) (Raschke et al., 2013). Pedersen et al. describieron como los músculos esqueléticos a través del proceso de la contracción liberan miocinas. Estas miocinas funcionan de manera similar a las hormonas ejerciendo un efecto endocrino sobre diversos órganos y además, pudiendo influir en el metabolismo y modificar producción de citocinas por tejidos y órganos. También se le ha asociado a las miocinas un efecto paracrino, actuando solo a nivel local (Pedersen et al., 2010; Pedersen and Febbraio, 2008).

Se conocen que existen actualmente más de seiscientas miocinas de las cuales la mayoría no está clara su función. Comprender la implicación fisiológica y biológica de las diferentes miocinas y su papel en la atrofia del músculo esquelético sería la llave del conocimiento para encontrar nuevas dianas terapéuticas.

Interleucina-6

La Interleucina 6 (IL-6) es una miocina con actividades pleiotrópicas; siendo una de las más estudiadas y caracterizadas por su implicación desde proliferación celular y diferenciación hasta en respuestas inflamatorias, con efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios. La IL-6 es un claro ejemplo del potencial de las miocinas reguladas por el ejercicio con efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos (Hoffman et al., 2017).

Esta citocina fue clonada y caracterizada por primera vez en torno a 1980 y pertenece a una amplia familia caracterizada por una estructura de cuatro hélices α entre cuyos miembros se encuentran IL-11, IL -27, IL-31 entre otros. Una de las características que definen a esta familia es que emiten señales a través de la proteína transmembrana gp130 (CD130) expresada de forma ubicua (Rose-John, 2006). El artículo de la liberación de IL-6 por los músculos esqueléticos durante la contracción en un grado suficiente para

aumentar sus niveles circulantes (Steenberg et al., 2000) abrió el camino para la caracterización experimental del músculo como un órgano endocrino (Pedersen and Febbraio, 2008).

La IL-6 es una proteína glicosilada con una masa molecular de 22 a 27 kDa, según la fuente celular y la cantidad de modificación postraduccional (Haegeman *et al.* 1986; Hirano *et al.* 1986). Se sintetiza como una proteína precursora de 212 aminoácidos (aa), con 28 aa secuencia señal y un segmento maduro de 184 aa (Hirano et al., 1994).

Esta interleucina se localiza principalmente en miofibras (Hiscock et al. 2004), pero también se ha demostrado su presencia en células satélite (McKay et al. 2009) y fibroblastos (Malm et al. 2004), siendo necesaria para diversos procesos y funciones en el organismo como la proliferación de mioblastos y células satélite. Ha sido demostrado que el aumento local de IL-6, regulado por una secreción autocrina, no solo conduce a esta proliferación de células satélite, sino también a su diferenciación y fusión desempeñando así un papel dual en la miogénesis (Austin and Burgess, 1991; Austin et al. 1992; Cantini *et al.* 1995). No obstante, también está implicada en otros procesos en los cuales al aportar IL-6 se dan mejoras en este como la diferenciación de mioblastos (Okazaki *et al.* 1996).

Se ha demostrado que la secreción de IL-6 se libera directamente de las células musculares en experimentos de cultivo celular, pero también en experimentos in vivo, donde se ha demostrado que la IL-6 se libera del tejido muscular en respuesta a la contracción (Steenberg et al., 2002); para una revisión, (Peake et al., 2015). La contracción celular inducida por estimulación eléctrica directa libera IL-6 tanto en cultivos de roedores (Farmawati et al., 2013; Bustamante et al., 2014), como de humanos (Scheler et al., 2013; Tarum et al., 2017).

La IL-6 producida por el ejercicio actúa tanto de manera autocrina, en el propio músculo esquelético que la libera, como en otros tejidos, como el sistema nervioso y el esqueleto. El grupo de Pedersen demostró que la contracción del músculo esquelético humano libera cantidades significativas de IL-6 en la circulación durante el ejercicio prolongado (Steenberg et al., 2000). Posteriormente destacó la importancia de la IL-6 derivada del músculo en el metabolismo (Pedersen and Febbraio, 2008).

No fue hasta 2002 cuando se demostró que durante la contracción muscular aumentan la transcripción de IL-6 en el músculo esquelético y su liberación a la circulación en grandes volúmenes en respuesta a la contracción (Steenberg et al., 2002). El aumento de las concentraciones circulantes de IL-6 se ve afectado tanto por la intensidad como por la duración de la contracción muscular (Malm et al., 2000).

En respuesta al ejercicio se ha considerado a la IL-6 como una citocina con efectos inmunomoduladores, demostrándose, que el nivel de IL-6 circulante aumenta drásticamente (hasta 100 veces) en respuesta al ejercicio (Pedersen et al., 2000). La consolidación de que existen mayores niveles de IL-6 después del ejercicio fue uno de los eventos más destacables de los estudios de esta citocina (Northoff et al., 1994; Ostrowski et al., 1998a, Ostrowski et al., 1998b, Ostrowski et al., 1999, 2000; Steenberg et al., 2000), demostrándose que el nivel de IL-6 aumenta con la duración del ejercicio y también está relacionado con la intensidad del ejercicio (Ostrowski et al., 1998a). Existen

evidencias que respaldan la idea de que exista una correlación entre la intensidad del ejercicio y el aumento de IL-6 en plasma, siendo demostrado que la contracción del músculo esquelético per se es la principal fuente de IL6 en la circulación en respuesta al ejercicio. (Ostrowski et al., 2001).

Estudios demuestran que se pueden detectar varias citoquinas en el plasma durante y después del ejercicio (Pedersen et al., 2000; Pedersen *et al.* 2001); Las concentraciones plasmáticas de IL-6, inducidas por el ejercicio, aumentan de manera casi exponencial. El nivel máximo de IL-6 se alcanza al final del ejercicio o transcurrido un corto periodo de tiempo, seguido de una rápida disminución hacia los niveles basales al comenzar el ejercicio (Pedersen et al., 2007).

El aumento en los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) se acompaña de un aumento dramático en IL-6. El TNF- α es también una citocina la cual está implicada en estimular la fase aguda de la reacción inflamatoria. TNF- α e IL-6 están estrechamente relacionados; el TNF- α estimula la producción de IL-6. Por otro lado, los estudios in vitro (Fiers, 1991), así como estudios en animales (Mizuhara et al., 1994; Matthys et al., 1995) sugieren que la IL-6 puede inhibir la producción de TNF- α y se ha sugerido que La IL-6 debe clasificarse como una citocina antiinflamatoria (Tilg et al., 1997). No obstante, es importante resaltar la respuesta de IL-6 al ejercicio no está precedida por un aumento de TNF- α . Este hallazgo contrasta con la hipótesis de que el aumento de IL-6 durante el ejercicio es una respuesta clásica de fase aguda iniciada por daño local en los músculos activos, ya que el aumento de IL-6 en la circulación ocurre durante el ejercicio dinámico sin ningún signo de daño muscular (Fisher, 2006).

Efectos metabólicos y antiinflamatorios de la IL-6

El músculo esquelético puede modificar el tipo y la cantidad de proteínas en respuesta al ejercicio regular. El ejercicio físico induce la transcripción de diversos genes metabólicos cuando el músculo esquelético se contrae (Pilegaard et al., 2000). Se ha demostrado que existe una transcripción del gen IL-6 en las células musculares durante la contracción, y que esta interleucina se libera a la sangre en grandes cantidades en el ejercicio (Pedersen et al., 2001; Pedersen et al., 2003; Febbraio and Pedersen, 2002). La liberación de IL-6 y de otras mioquinas en el músculo esquelético humano es considerado el desencadenante de diversos efectos sistémicos beneficiosos de la actividad física (Severinsen et al., 2020; Pedersen and Febbraio, 2008). Los efectos de la IL-6 sobre el metabolismo, la respuesta inmunológica, la función muscular y la proliferación celular implican que su liberación este sometida a un proceso estrictamente regulado.

La presencia de una alta concentración de IL-6 mostraría un indicio de diversos trastornos en la salud, presentando estos niveles aquellos pacientes con síndrome metabólico pueden explicarse por el hecho de que la IL-6 se produce en el tejido adiposo (Mohamed-Ali *et al.* 1997; Fried *et al.* 1998). El tejido adiposo produce y libera TNF- α (Tsigos et al., 1995) existiendo evidencias de su papel en la resistencia a la insulina y, por tanto, su regulación a la baja de GLUT-4 e inhibición de la actividad del receptor de insulina (Hotamisligil, 1999).

Se ha demostrado que tanto la producción como la liberación de IL-6 en el músculo esquelético durante la contracción muscular depende de la disponibilidad de sustrato glucógeno; por tanto, cuando dicho glucógeno presente en el músculo se encuentra a bajas concentraciones, se produce y libera más IL-6 durante el ejercicio. Esto refuerza la idea de que la IL-6 procedente del músculo esquelético funciona como un sensor de energía (Pedersen et al., 2012). Esto es una clara evidencia de que la IL-6 puede estar involucrada, en parte, en la mediación de la captación de glucosa durante el ejercicio debido a que el aumento de la expresión de IL-6 es proporcional al aumento de captación de glucosa durante el ejercicio (Steensberg et al., 2001a; Steensberg et al., 2001b).

Se sabe que el metabolismo de los carbohidratos aumenta con el aumento de la intensidad del ejercicio, lo que refleja un mayor recambio de glucógeno muscular, así como una mayor captación de glucosa plasmática por parte de los músculos (Wahren, 1970; Romijn *et al.* 1993; Kristiansen *et al.* 2000). En el transcurso del ejercicio a lo largo del tiempo la descomposición del glucógeno muscular disminuye (Coyle et al., 1986). Se ha demostrado que la liberación de IL-6 del músculo activo está relacionada tanto con la intensidad del ejercicio como con la absorción de glucosa, por lo que dicha interleucina contribuye a la homeostasis de la glucosa durante el ejercicio (Helge et al., 2003).

En general, las citocinas plasmáticas encontradas después del ejercicio sugieren que el ejercicio induce un fuerte efecto antiinflamatorio (Febbraio and Pedersen, 2002). Evidencias respaldan que la IL-6 probablemente también media en algunos de los efectos antiinflamatorios e inmunorreguladores del ejercicio (Pedersen et al., 2003; Pedersen et al., 2012). Por tanto, la liberación de IL-6 inducida por el ejercicio podría explicar algunos de los efectos beneficiosos del ejercicio como un mejor control glucémico, pérdida de masa grasa, supresión del crecimiento tumoral o mantenimiento de la masa muscular entre otros (Hoffman et al., 2017).

A pesar de la abundante literatura sobre la liberación muscular de IL-6 en las últimas dos décadas, la evidencia sobre el mecanismo celular y molecular subyacente es escasa. Los experimentos de cultivo sugieren que los estímulos iniciales que conducen a la secreción parecen ser la despolarización de la membrana (citado anteriormente), el estrés mecánico (Peterson et al., 2009) y los receptores purinérgicos (Bustamante et al., 2014; Ito et al., 2018). Una serie de publicaciones en cultivos de roedores y fibras adultas han demostrado que la despolarización del sarcolema libera, mediante canales de panexina, suficiente ATP para activar los receptores purinérgicos que conducen a la liberación de IL-6 (Bustamante et al., 2014; Buvinic et al., 2009; Juretic et al., 2006). Otros estímulos celulares también podrían inducir la liberación de IL-6. Los receptores adrenérgicos pueden inducir la secreción en los músculos de los roedores (Mattingly et al., 2017; Frost et al., 2004), cultivos (Frost et al., 2004) y también en humanos durante el ejercicio (Hostrup et al., 2022). El óxido nítrico (Makris et al., 2010) y la hipertermia (Welc et al., 2012) también pueden liberar IL-6 en modelos de roedores.

En cuanto a las vías intracelulares implicadas en la secreción de IL-6, artículos en modelos humanos y de roedores han identificado la participación de varias vías de transducción, como Stat3 (Bustamante et al., 2014), JNK/MAPK (Frost et al., 2004), Srf (Guerci et al., 2012) y AMPK (Weigert et al., 2012; Klymenko et al., 2020). Además, los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Juretic et al., 2006) y el regulador epigenético

HDAC5 (Klymenko et al., 2020) parecen promover e inhibir la liberación de IL-6. La transcripción y liberación de IL-6 en el músculo parece implicar algunos mecanismos de retroalimentación similares a los de otros tejidos. Se ha propuesto que la IL-6 ejerce un bucle autocrino positivo en las células musculares de roedores que implica la síntesis de ARNm (Bustamante et al., 2014). En consonancia con esto, se ha propuesto que la secreción de IL-6 está regulada en el nivel de procesamiento del ARNm a través de proteínas reguladoras que interfieren con la transcripción (Peake et al., 2015; Geyer et al., 2012).

Los eventos transcripcionales son pieza angular en las adaptaciones metabólicas del músculo esquelético. La expresión de genes esenciales para el metabolismo de la glucosa y los lípidos está coordinada con el cambio en la utilización de sustratos. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) regula programas de expresión génica metabólica del músculo esquelético en respuesta a los cambios en el estado energético, regulando la actividad de enzimas metabólicas clave mediante la fosforilación (Long y Zierath, 2008; Pedersen et al., 2010). Múltiples estudios apuntan a la idea de que existe un efecto de la IL-6 sobre la AMPK, proporcionando diversos estudios evidencias de que las vías dependientes de la AMPK regulan la liberación de IL-6 del músculo esquelético oxidativo aislado (Glund et al., 2009).

Diversos grupos han informado de la participación de algunos elementos de las señales de Ca^{2+} en la secreción de IL-6. La evidencia actual indica que tanto los depósitos de Ca^{2+} de IP_3R (Bustamante et al., 2014) como de RyR (Ducreux et al., 2004) están involucrados. Los iones Ca^{2+} extracelulares (Furuichi et al., 2018) y las señales citosólicas de Ca^{2+} (Ito et al., 2018; Weigert et al., 2007) también parecen ser necesarias en cultivos de roedores, pero las vías de entrada de Ca^{2+} no se han estudiado. La participación del Ca^{2+} independientemente de los mecanismos de señalización vinculados a los receptores también está respaldada por el hallazgo de que la calmodulina (Hu et al., 2019) en linfocitos de ratón y calcineurina en cultivos de esqueleto humano (Keller et al., 2006) y cultivos y músculos de roedores (Allen et al., 2010) pueden mediar en la liberación de IL-6.

Receptores

IL-6 pertenece a una familia de citocinas que consta de 10 ligandos y 9 receptores; esta familia posee una estructura y transductor de señales en su complejo receptor común, que desempeña funciones muy diversas en el cuerpo. La IL-6 ejerce sus actividades biológicas a través de 2 moléculas: IL-6R (también conocida como IL-6R α , gp80 o CD126) y la proteína transmembrana gp130 (Kishimoto et al., 2005; Kang et al., 2019).

IL6-R comprende de un dominio similar a Ig, el cual funciona como un sitio de interacción de ligando (Bazan, 1990; Bazan, 1990); una región que atraviesa la membrana; y un dominio citoplasmático corto que es prescindible para la transducción de señales. La señalización ocurre cuando el complejo IL-6/IL-6R se asocia con la proteína transmembrana gp130; esta glicoproteína de 130kD, citada con anterioridad, es otro componente del receptor que funciona como transductor de señales de IL-6 (Hibi et al.,

1990). La caracterización y clonación de IL6-R y gp130 dilucido que el mecanismo del receptor de IL-6 en el cual IL-6 se une al IL-6R solo, y este complejo se asocia con gp130 para inducir la señalización (Hibi et al., 1990; Taga et al., 1989).

El carácter pleiotrópico de las funciones de la IL-6 se ha atribuido a la capacidad del receptor. El IL6-R puede escindir de la superficie celular para quedar en el espacio extracelular en forma soluble como sIL-6R, pudiendo formar un complejo con IL-6. Este complejo puede actuar sobre otras células asociándose a la proteína gp130, lo que explica dicha función pleiotrópica (Mackiewicz et al., 1992). El receptor soluble sIL-6R se encuentra presente en el suero humano y está involucrado en la señal de citocinas. Además de por escisión proteolítica del receptor de la superficie celular puede formarse, en menor medida, por corte y empalme alternativo del ARNm del receptor (Narazaki et al., 1993). El complejo de IL-6 y el IL-6R soluble también puede estimular las células que no expresan el IL-6R denominándose este modo de señalización trans-señalización de IL-6, mientras que la señalización a través del IL-6R unido a la membrana se denomina Señalización clásica IL-6 (Garbers et al., 2011). Esta interacción IL-6/sIL-6 junto con dos moléculas de gp130 forman un hexámero mediando la trans-señalización o señalización clásica citadas (Boulanger et al., 2003).

El desarrollo del anticuerpo monoclonal recombinante humanizado antihumano, tocilizumab (TCZ), permite poder inhibir la unión de IL-6 a IL-6R debido a estar dirigido contra los receptores de interleucina 6 (IL-6R) solubles y unidos a la membrana y, por lo tanto, tener la capacidad bloquear la cascada de señalización de IL-6R. El TCZ como anticuerpo neutralizante contra IL-6 e IL-6R bloquea las vías de señalización clásica y trans, siendo capaz de disociar el complejo IL-6–sIL-6R. La señalización trans de IL-6 es proinflamatoria, mientras que la señalización clásica de IL-6 es necesaria para las actividades regenerativas o antiinflamatorias de la citocina, siendo un inhibidor modelo para terapia para enfermedades inflamatorias crónicas y agudas (Kang et al., 2019).

Vía de señalización de IL-6

Como se ha citado con anterioridad al definir IL-6, esta citoquina pertenece a una familia que se unen a diferentes receptores específicos transmitiendo señales a través del receptor tirosina quinasa gp130. gp130 se expresa de manera ubicua en todo el cuerpo, mientras que la distribución del receptor de IL-6 (IL-6R) es más restringida (Hibi et al. 1990; Saito et al. 1992). IL-6 tiene receptores ubicados en la membrana de las células diana (IL6R), cuando la IL-6 se une a estos receptores, este se une al receptor de tirosina quinasa gp130 sufre una dimerización y, como consecuencia, recluta Janus cinasas 2 citoplasmática (JAK2) que está asociada constitutivamente con la región citoplasmática de gp130. JAK2 fosforilan el transductor de señales y el activador de la transcripción 3 (STAT3), el cual STAT3 sufre una dimerización y se transloca desde el citoplasma al núcleo donde STAT3 activa la transcripción de varios genes diferentes (Figura 11).

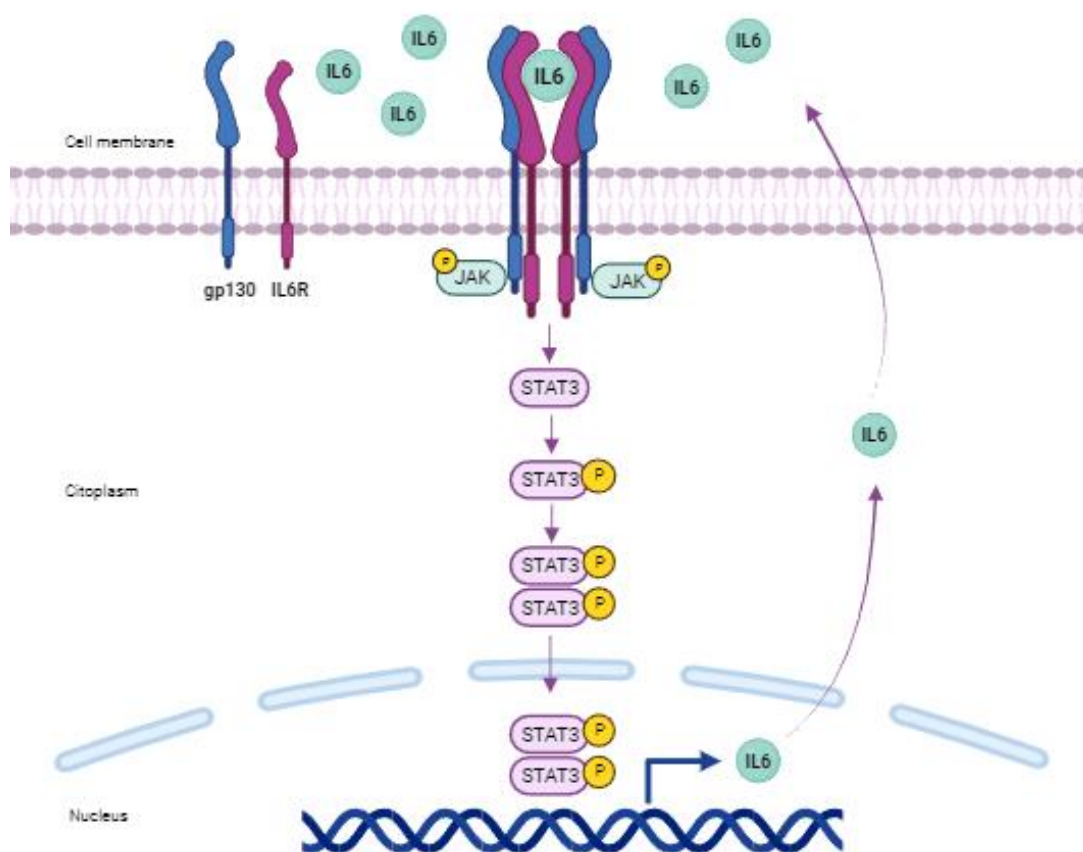


Figura 11. Vía de señalización de IL6 (JAK/STAT3)

Esta activación de distintas vías de señalización JAK/STAT por parte de IL-6 modula la miogénesis dependiente de células satélite (Muñoz-Canovas et al., 2013). Dicha vía se ha asociado con la promoción de la proliferación y/o diferenciación de mioblastos, siendo un hecho que las distintas acciones miogénicas parecen depender de los mediadores intracelulares que intervienen en cada paso de la vía JAK/STAT. Durante el proceso de la regeneración muscular las células satélite en proliferación mantienen activado el STAT3 (Kami and Senba, 2002) y los mioblastos cultivados muestran expresión de STAT3 activado cuando se estimulan con LIF (Megney et al., 1996).

La dimerización del receptor de tirosina quinasa gp130 no solo desencadena la vía de transducción de señales a través de STAT3, también provoca la activación de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI-3 quinasa (PI3K)) y la cascada de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Hirano et al., 1997).

Se ha propuesto que el Ca^{2+} libre intracelular puede actuar como segundo mensajero regulando la expresión de IL-6 en el músculo esquelético, posiblemente a través de la fosfatasa calcineurina dependiente de Ca^{2+} (Allen et al., 2010; Banzet et al., 2015). Esto concordaría con las evidencias que existen señales de Ca^{2+} de baja intensidad sostenidas en el tiempo las cuales activan el factor nuclear de células T activadas (NFAT) a través de la acción de la calcineurina (Dolmetsch et al., 1998; Frost et al., 2002; Im et al.,

2004) y la expresión del gen IL-6 en células musculares humanas cultivadas (Keller et al., 2006). La actividad contráctil del músculo esquelético de forma prolongada también se caracteriza por una baja concentración intracelular de Ca^{2+} , por tanto, es posible que la contracción muscular active la transcripción del gen IL-6 a través de la señalización de NFAT (Rao et al., 1997)

La calcineurina o fosfatasa 2B es una proteína fosfatasa de serina-treonina ubicada en el citosol (Rao et al., 1997; Crabtree, 1999) presente en concentraciones 10 veces más altas en músculo que en otros tipos celulares. Una vez activada se une a la NFAT y la desfosforila, promoviendo su traslación al núcleo donde se asocia con otros factores de transcripción (Olson and Williams, 2000). Además de esta vía, la transcripción del gen IL-6 durante las contracciones musculares sostenidas podría también deberse durante situaciones de contracción máxima a la vía NF- κ B y JNK. En el músculo esquelético se produce un aumento de la actividad de la vía JNK durante la contracción muscular (Boppart et al., 2000) y aunque su efecto sobre la transcripción de IL-6 es desconocido existen evidencias de que JNK regula la expresión del gen IL-6 en monocitos a través de NF- κ B (Tuyt et al., 1999).

Esta regulación de IL-6 a través de la vía Ca^{2+} /NFAT no representa la totalidad de su regulación, también ha sido demostrado que el contenido de glucógeno intramuscular juega un papel importante en la regulación de este gen. Cuando a nivel intramuscular se da un agotamiento del contenido de glucógeno no solo es una condición limitante en lo que a disponibilidad de energía se refiere, también puede conllevar un efecto en diferentes procesos celulares como la transcripción de genes (Hargreaves, 2004). Existen evidencias de que bajas concentraciones de glucógeno durante el ejercicio prolongado activa p38 MAPK, siendo una proteína quinasa activada por estrés y durante la contracción muscular (Akira and Kishimoto, 1992; Goodyear et al., 1996; Williamson et al., 2003), para potenciar la transcripción de IL-6 en los músculos que trabajan (Chan et al., 2004).

El mecanismo de activación de p38 MAPK está regulado por la fosforilación de un residuo de treonina y tirosina a través de una acción combinada de MAPK quinasa (MKK)-3 y -6 (Raingeaud et al., 1995); posteriormente al encontrarse activa puede permanecer en el citosol (Ben-Levy et al., 1998) o trasladarse al núcleo (Raingeaud et al., 1995). Existe la posibilidad de que exista una relación entre la fosforilación de p38 MAPK en el núcleo y la transcripción de IL-6 en el músculo esquelético, ya que existen evidencias de que un contenido reducido de glucógeno intramuscular aumenta la fosforilación de p38 MAPK en el núcleo (Chan et al., 2004).

La regulación transcripcional de IL-6, al igual que sus regiones promotoras y potenciadoras han sido las más estudiadas. Estas regiones contienen múltiples elementos reguladores en cis para diversos factores de transcripción (TF) que actúan en trans. Varios de estos TF, como NF- κ B, NF-IL-6, proteína activadora 1 (AP-1), proteína de especificidad 1 (SP-1) y factor regulador 1 de IFN (IRF1), activan la transcripción de IL-6 (Akira and Kishimoto, 1992).

Existen múltiples estudios en músculo de roedores enfocados en los mecanismos celulares responsables de la secreción de IL-6 (Bustamante et al., 2014; Lauritzen et al., 2013; Juretic et al., 2006; Buvinic et al., 2009; Frost et al., 2004; Guerci et al., 2012; Weigert

et al., 2007; Klymenko et al., 2020). Respecto a la vía del Ca^{2+} , solamente se ha estudiado su papel de manera parcial, con algunos estudios fragmentarios en humanos (Ducreux et al., 2004; Keller et al., 2006) y roedores (Bustamante et al., 2014; Buvinic et al., 2009; Ito et al., 2018; Furuichi et al., 2018).

Retroalimentación IL-6

Diversos estudios en diferentes tejidos han propuesto que la expresión de la IL-6 puede ser el resultado de la propia acción de la IL-6 extracelular a través de un mecanismo de retroalimentación (Franchimont et al., 1997; Keller et al., 2003; Shouda et al., 2006; Weigert et al., 2007). IL-6 extracelular se une a su receptor de membrana (IL6-R) a través del cual induce la activación de la tirosina quinasa 2 activada por Janus (JAK2) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Shuai et al., 2003). Se ha comprobado a través de la inhibición farmacológica de la vía JAK2/STAT3 que la cascada de señalización que genera este proceso está relacionada con la expresión de IL-6, debido a que dicha inhibición bloquea la secreción y expresión de la citocina; estos resultados fueron parejos a la sobreexpresión del inhibidor natural de la vía (SOCS3) (Shouda et al., 2006).

Es un hecho la presencia de un mecanismo de retroalimentación positiva en respuesta a la IL-6 en varios tipos de células, como los osteoblastos (Franchimont et al., 1997), las células hepáticas (German et al., 2011; Shah et al., 2005) y las células inmunes (Verboogen et al., 2018). En el músculo esquelético, existen algunos artículos que describen este bucle autocrino in vivo en humanos (Keller et al., 2003) y células de roedores (Bustamante et al., 2014). La IL-6 liberada al exterior actúa como un factor estimulador autocrino promoviendo su expresión y producción; este evento se traduce en un aumento de los niveles de proteína y ARNm de IL-6 (Weigert et al., 2007; Bustamante et al., 2014). Ha sido descrito que STAT3 ejerce una función pleiotrópica sobre el músculo debido a que es capaz de modular la señalización de IL-6 a nivel transcripcional aumentando la síntesis de esta interleucina además de participa en el circuito de retroalimentación negativa de la IL-6 fruto de la inhibición por SOCS3 del complejo JAK2-STAT3 (Bustamante et al., 2014; Ilangumaran et al., 2004; Shuai, 2003).

SOCS3 pertenece a la familia de supresores de genes de señalización de citoquinas (Yasukawa et al., 2000) se expresan en niveles bajos en células no estimuladas y son inducidas de manera inmediata por citocinas, inhibiendo así la señalización JAK2-STAT3 y formando un clásico circuito de retroalimentación negativa como se ha citado con anterioridad. Esta inhibición de JAK2 por SOCS3 requiere la unión de SOCS3 al receptor activo, por tanto, inhibe la activación de STAT al competir con las STAT por la unión a los sitios de acoplamiento del receptor (Sasaki et al., 2000; Nicholson et al., 1999; Yoshimura, 1998).

Existen numerosos estudios sobre la transcripción de IL-6 y la activación de la vía STAT3 de los receptores de IL-6. STAT3 se caracteriza por ser activada por la IL-6 al unirse a sus receptores celulares (Kamimura et al., 2003), siendo al mismo tiempo un mediador

de la secreción de IL-6 en células del músculo esquelético (Bustamante et al., 2014), células tumorales (Mikyskova et al., 2023) y macrófagos (Samavati et al., 2009).

Se ha descrito que el efecto autocrino de la IL-6 está mediado por la endocitosis y el compartimento endocítico vesicular en células inmunes y hepáticas (Verboogen et al., 2018; German et al., 2011; Shah et al., 2006); no obstante, no existen datos sobre su presencia en células musculares.

ENVEJECIMIENTO

Concepto y bases celulares

El envejecimiento es un proceso caracterizado por una progresiva pérdida de integración fisiológica que lleva a alteraciones funcionales y al incremento en la vulnerabilidad a la muerte. Una influyente revisión sistematizó los rasgos celulares distintivos del envejecimiento: inestabilidad genética, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, reducción de la proteostasis, desregulación de la detección de nutrientes, senescencia celular, disfunción mitocondrial, alteraciones en comunicación intercelular y agotamiento de las células madre (López-Otín et al., 2013).

La senescencia celular es una posible respuesta compensatoria para eliminar células dañadas con potencial oncogénico. Comprende, además de pérdida irreversible de la capacidad de replicación celular (mediada por las proteínas p53 y p16INK2a), la aparición de un fenotipo senescente con cambios morfológicos y funcionales (hipersecreción, estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo, desensibilización de vías de señalización y de apoptosis) asociado a la activación de vías de señalización (MAPK/PI3K/mTOR) (Blagosklonny et al., 2012). Aunque casi toda la información sobre senescencia celular proviene de células mitóticas, también se ha descrito su presencia in vivo en células postmitóticas como neuronas y músculo esquelético (Calvani et al., 2013).

El proceso de senescencia se ha atribuido a la activación a largo plazo de determinadas vías de señalización intracelular por la abundancia de nutrientes, como ocurre con la glucosa y el eje insulina/IGF-1 o los aminoácidos y Rag-GTPasas. Estas tienen efectos tróficos mediante la activación mTORC1 que favorecen la senescencia celular al inhibir la autofagia. Por el contrario, reducciones en la disponibilidad de energía celular (detectada por la AMPK al incrementarse el AMP y por SIRT1 al aumentar el NAD⁺), la hipoxia celular (mediante REDD1) y el estrés genotóxico (a través de p53) inhiben mTORC1, lo que se asocia a un aumento de longevidad tal y como ocurre en respuesta a la restricción calórica (Camello et al., 2012).

En cuanto a la pérdida de funcionalidad mitocondrial, otro de los factores más investigados en la actualidad, puede deberse a la reducción de su biogénesis, inhibición de la actividad mitocondrial mediada por la represión de PGC-1 α , incremento en señales apoptóticas que favorecen la permeabilización mitocondrial (Kroemer et al., 2007) y activación del inflammasoma (Green et al., 2011). Estos procesos pueden modularse por SIRT1, que activa a PGC-1 α , y por SIRT3, la principal deacetilasa mitocondrial. Así mismo

un desbalance de los procesos de fisión y fusión (que generan cambios morfológicos) puede comprometer la función mitocondrial induciendo senescencia (Wang et al., 2011).

La senescencia asociada al envejecimiento también afecta a las células madre, que sufren agotamiento funcional en el caso del músculo esqueléticos (Conboy and Rando, 2012), lo que tiene implicaciones en el desarrollo de la fragilidad asociada al envejecimiento.

Fragilidad y sarcopenia

La fragilidad es un síndrome geriátrico en el que se produce una disminución de la reserva funcional y resistencia a los estresores, debido al declive acumulado de múltiples sistemas fisiológicos, lo que origina pérdida de la capacidad homeostática y vulnerabilidad a eventos adversos. La definición fenotípica de este síndrome la hizo Fried en 2001 (Fried et al., 2001). Un sujeto es considerado frágil si cumple 3 o más de los siguientes criterios: pérdida de peso no intencionado, agotamiento, debilidad (medida por la fuerza prensora), lentitud (medida mediante la velocidad para caminar) y bajo nivel de actividad física. La importancia del síndrome de fragilidad es que es un fiel predictor de eventos graves en el anciano como mortalidad, institucionalización y el aumento de dependencia en actividades de la vida diaria, por lo que la búsqueda de biomarcadores de este proceso es un área en constante desarrollo.

El déficit motor en la fragilidad se debe a la reducción en la cantidad y funcionalidad de la masa muscular esquelética o sarcopenia. Caracterizada por una disminución del número y grosor de las fibras musculares, este proceso comienza ya a partir de los 30 años y se acentúa a partir de los 40-50 años (3-8% de reducción por década) (Baumgartner et al., 1998; Walston et al., 2012). Existe asociación entre sarcopenia y desequilibrios nutricionales, reducción de células satélites, de la actividad física y la exposición solar (Doherty et al., 2001). La sarcopenia es una consecuencia universal del envejecimiento y juega un papel central en el deterioro funcional en las últimas décadas de la vida.

La sarcopenia, término acuñado por primera vez por Rosenberg en 1989, es una afección relacionada con la edad caracterizada por la aparición de atrofia muscular y una disminución progresiva de la fuerza muscular que se agudiza con el paso del tiempo (Kim and Kim, 2020). Esto conlleva a un fallo en la capacidad de las células satélite del músculo esquelético para mantener una cantidad adecuada de masa tisular, al perder su capacidad de respuesta a estímulos para fusionarse y mantener el tamaño y número de las fibras musculares. Se ha demostrado que el deterioro de la función de las células satélite como fuente de nuevos mionúcleos puede estar relacionado con una disminución de la población de células satélite, la cual ha disminuido con la edad (Günther et al., 2013; Hwang et al., 2018).

Desde el punto de vista celular se considera que la sarcopenia se debe tanto a factores extramusculares (cambios hormonales, nutricionales y de la actividad física ligados a la edad, efectos de la grasa intramuscular, estado pro-inflamatorio) como al envejecimiento de las células musculares adultas y de las células satélites encargadas de su regeneración (Hwang et al., 2018; Teixeira et al., 2012; Romanick et al., 2013). Aunque

una reciente investigación indica que la senescencia de las células satélite causada por el factor de transcripción p16INK2a es la causa última de este proceso (Sousa-Victor et al., 2014), múltiples evidencias muestran la influencia de factores endocrinos en el desarrollo de la sarcopenia (Kalinkovich and Livshits, 2015). Además, la sarcopenia cursa con alteraciones en la autofagia, aumento de la apoptosis y daño oxidativo, y alteraciones mitocondriales que incluyen modificaciones en la dinámica mitocondrial (Calvani et al., 2013; Picca et al., 2018) y en el ADN, la función energética y la activación del poro de transición de estas organelas (Picard et al., 2011).

Hay algunas evidencias que muestran que con el envejecimiento se altera la secreción de miocinas. El envejecimiento reduce la expresión de PGC-1 α (PPAR γ coactivador 1 α) (Kang et al., 2013), un factor de transcripción que activa la biogénesis y función mitocondrial, es activado por el ejercicio y libera varias mioquinas con efectos sobre el tejido adiposo y el metabolismo energético (irisina, péptido similar a la metionina, IL-15) (Baumgartner et al., 1998; Rao et al., 2014).

Se ha demostrado la existencia de alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ producto de la senescencia (Delbono et al., 1995). Se ha descrito un desacoplamiento inducido por la edad entre las proteínas Cav1.x del sarcolema detectoras de la despolarización celular y los canales RYR1 que liberan el Ca²⁺ desde el retículo sarcoplásmico (ver sección Acoplamiento estímulo-contracción), lo que podría reducir la señal de Ca²⁺ y la fuerza contráctil del músculo esquelético durante el envejecimiento (Delbono et al., 1995; Wang et al., 2000).

Cambios en la homeostasis del calcio inducidos por el envejecimiento

La vía de señalización del Ca²⁺ tiene un papel clave en las células musculares, no solamente por el estrecho control que ejerce sobre la contracción (con sus implicaciones motoras y vasculares), sino porque la frecuencia y amplitud de las señales de Ca²⁺ regulan la plasticidad del músculo (Tavi and Westerblad, 2011) al controlar diversas proteínas reguladoras de la transcripción (NFK β , NFAT, MAPK y otras). Las señales de Ca²⁺ regulan la expresión genética en el músculo esquelético, y la miogénesis y los factores de transcripción responsables de la diferenciación muscular están regulados por proteínas controladas por el Ca²⁺ citosólico, la fosfatasa calcineurina, las quinasas activadas por calmodulina y las enzimas calpaínas (William et al., 2002; Tu et al., 2016). Esto implica que los posibles cambios que ocurren en la señal de Ca²⁺ durante el envejecimiento pueden ser el mecanismo o la causa de la sarcopenia.

El envejecimiento produce cambios en la señal de Ca²⁺ en diversos tejidos (para una revisión, <https://www.secf.es/document/revistaPDF/2017-SECF-Julio%20Revista.pdf>). El envejecimiento afecta a múltiples parámetros de la señal: reduce a la capacidad citosólica de amortiguación de Ca²⁺ (*calcium binding capacity*) (Satrústegui et al., 1996), la actividad de los sistemas de extrusión de Ca²⁺ (Gómez-Pinilla et al., 2007), las señales mitocondriales de Ca²⁺ (Camello-Almaraz et al., 2008) o el tamaño de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ (Gómez-Pinilla et al., 2011). Esto tiene consecuencias funcionales, como por ejemplo alteraciones en la cinética espaciotemporal de la señal

(Martin-Cano et al., 2015) o la excitabilidad celular (Toescu and Verkhratsky, 2007) y la contracción del músculo liso (Gómez-Pinilla et al., 2011).

En el músculo esquelético se ha descrito, entre otros efectos, que el envejecimiento reduce la excitabilidad y las señales de Ca^{2+} (Payne et al., 2009) y la captación de Ca^{2+} por el RS en músculo humano (Hunter et al., 1999) y el acoplamiento entre los puntos de liberación de Ca^{2+} desde el RS y las mitocondrias (Pietrangelo et al., 2015).

OBJETIVOS

Los objetivos iniciales de la presente tesis, basados en la hipótesis de que el envejecimiento produce alteraciones en los cultivos primarios de músculo esquelético humano, eran:

- 1- Estudiar el efecto del envejecimiento sobre la secreción estimulada de IL-6
- 2- Estudiar posibles cambios en la señal de Ca^{2+} en respuesta al ATP debidos al envejecimiento.

Los resultados que se han ido obteniendo durante el estudio han llevado a la formulación de otros objetivos adicionales:

- 1- Estudiar de una forma sistemática el papel de los principales elementos de la señal de Ca^{2+} en la secreción de IL-6 en respuesta a ATP, y la posible presencia de elementos de autorregulación por IL-6
- 2- Estudiar el papel de la panexina-1 en la entrada de Ca^{2+} acoplada a excitación en fibras musculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos primarios de músculo esquelético humano

Aislamiento de cultivos primarios

El presente estudio se ha realizado con muestras de músculo esquelético humano procedentes del Hospital Universitario (Cáceres), fue aprobado por los Comités Éticos de la Universidad de Extremadura y del Hospital Universitario de Extremadura (Servicio Extremeño de Salud) (ref IB18025) y siguió las normas de la Declaración de Helsinki de 1975. Dicho estudio se realizó en 14 donantes, con edades entre 22 y 70 años: 11 hombres y 3 mujeres. Todos ellos cumplían las condiciones de inclusión expuestas a continuación: no haber sido diagnosticados de diabetes, síndrome metabólico, trastornos musculares o neurológicos ni insuficiencia hepática o renal, y no estar bajo tratamiento con fármacos anabólicos o fármacos que actuaran en la placa terminal del músculo.

Los cultivos primarios utilizados estaban formados por células en monocapa debido a su adhesión y crecimiento sobre un soporte sólido; con capacidad de proliferar gracias a factores de crecimiento, producidos por las mismas células que del cultivo, ocupando toda la superficie de cultivo hasta alcanzar un estado de confluencia. Este crecimiento permitió desarrollar subcultivos o pases a partir del cultivo inicial, obtenido de células madre tras la disgregación del tejido muscular de los donantes humanos.

Para obtener los cultivos primarios humanos, se utilizaron pequeños fragmentos de músculo esquelético abdominal desechados durante laparotomías en diversas intervenciones quirúrgicas y mantenidas en una solución Krebs-Henseleit (KH) estéril (Tabla 1) a 4°C hasta su recepción en nuestro laboratorio de investigación. Las muestras se limpiaron, eliminándose los restos de vasos sanguíneos, restos de tejidos cauterizados fruto de la intervención y el tejido graso, todo ello con ayuda de una lupa binocular Nikon SMZ800; una vez limpias, se cortaron en pequeños fragmentos de 1 mm y se pasaron a una solución de BSA KH de 1 mg/ml.

A continuación, se realizó la digestión enzimática y mecánica de los fragmentos de músculo esquelético. La digestión enzimática se llevó a cabo incubando los fragmentos de tejido con una solución de papaína (1mg/ml, 15 min, con 1mg/ml ditioeritritol) y a continuación de colagenasa (1mg/ml, 5 min) ambas a 37°C (Tabla 2). Tras la digestión, los fragmentos se lavaron con una solución enzimática a 4°C (Tabla 2) para retirar los restos de papaína y colagenasa.

Tras el lavado, los fragmentos digeridos se sometieron a una digestión mecánica en solución enzimática a 4°C, haciendo pasar el tejido por puntas de pipetas de mayor a menor calibre, hasta que el pipeteo no mostró resistencia alguna al paso del tejido. La solución, ya digerida mecánicamente, se hizo pasar a través de filtros de diverso calibre (100 µm y 70 µm) con medio de crecimiento (GM) (Tabla 3) y se centrifugó a 1600 rpm durante 8 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en GM y se transfirió a una placa de Petri durante 1h para que los fibroblastos se adhirieran a la placa y poder así eliminarlos del cultivo. El sobrenadante de esta placa se sembró en un matraz de cultivo, recubierto de colágeno previamente (50 µg/mL 90-120 min) y se incubó en condiciones óptimas (37 °C, 5% CO₂), con GM, lo que permitió que las células satélites proliferaran y

se diferenciaron en mioblastos. Cada cultivo se revisó diariamente y se reemplazaron los medios cada dos días.

Cuando el cultivo alcanzó un estado de confluencia celular óptimo, entre el 80-90%, se retiró el medio y se lavó con PBS 2-3 veces para retirar el exceso de proteínas procedentes del suero. Posteriormente se añadió tripsina-EDTA (2.5 g/L tripsina y 0.2 g/L EDTA en solución Hanks (Sigma)) y tras 2.5-3 minutos se diluyó ≥ 5 veces con GM y se centrifugó (1600rpm 8min). El pellet se resuspendió en GM y se procedió a contar el número de células satélites mediante una cámara de Neubauer. Para llevar a cabo la congelación se añadió un medio específico (Tabla 3) y se pasó a criotubos estériles que se congelaron de forma gradual, para posteriormente ser congelados en nitrógeno líquido.

Cultivo primario de músculo esquelético humano

Los cultivos primarios se llevaron a cabo, según el diseño experimental, en placas o matraces que se pretrataron con colágeno (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a partir de solución comercial (rat tail, Gibco A10483-01; 3mg/ml) diluida en acético 0.02M añadiendo 0.1 mL/cm^2 de superficie de cultivo). Se utilizó medio de crecimiento (GM) y diferenciación (DM) (Tabla 3-4), preparados a partir de medio base DMEM/Ham's F12 1:1, reconstituido con penicilina/estreptomocina (10000u/mL y 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y gentamicina (50 mg/mL) para prevenir las contaminaciones de los cultivos.

La siembra de los cultivos primarios se realizó bien con células procedentes de un pase anterior, tripsinizado y resuspendido en medio de crecimiento (GM), o con células congeladas en nitrógeno líquido resultado de la digestión o de pases posteriores congelados. Las siembras se llevaron a cabo con una concentración de células entre 6000-7000 células/ cm^2 en medio de crecimiento (GM). Este medio se reemplazó cada dos días hasta que el nivel de confluencia celular alcanzó el 80 -90 %, momento en el que el GM se sustituyó por medio de diferenciación (DM). En estas condiciones, los mioblastos en proliferación se fusionaron hasta formar miotubos, diferenciados y multinucleados (núcleos agrupados y en cadena), precedentes in vitro de las fibras musculares adultas.

KREBS	mM
NaCl	113
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
D-GLUCOSA	11,5
CaCl ₂	2,5

Tabla 1. solución Krebs-Henseleit (KH)

SOLUCIÓN ENZIMÁTICA MADRE	40% BSA (Albúmina de Suero Bovino)
PAPAÍNA	1mg Papaína/1ml Solución enzimática 10mg DTT/1ml
COLAGENASA	1mg Colagenasa/1ml Solución enzimática 1mM CaCl ₂

Tabla 2. Composición soluciones digestión enzimática.

	DMEM reconstituido	Suero	Insulina	Otros componentes
Medio de crecimiento (GM)	80 % DMEM	20% Suero fetal bovino (FBS) (Gibco)	10 µg/mL	bFGF (1 ng/mL) EGF (10 ng/mL) Dexametasona (0.4 µg/mL)
Medio de diferenciación (DM)	98 % DMEM	2% Suero de caballo (HS) (Gibco)	10 µg/mL	
Medio de congelación	60% DMEM	30% Suero fetal bovino (FBS) (Gibco)		10 % DMSO

Tabla 3. Composición de medios de cultivo.

	Composición factores de crecimiento
bFGF	vial bFGF (10 µg) (Gibco) H2O o Tris (10 mM, pH 7.6) Tris 0.1% BSA
EGF	vial EGF (100 µg) (Gibco) H2O o Tris (10 mM, pH 7.6) Tris 0.1% BSA
Dexametasona	Etanol puro (1:1) Medio base (1:25)

Tabla 4. Composición factores de crecimiento.

Estudio de la secreción de il-6 en cultivos primarios de músculo esquelético humano

A través de los experimentos de secreción se determinó la cantidad de interleucina 6 (IL-6) secretada en un cultivo primario de músculo esquelético humano en presencia y ausencia de diversos estimulantes e inhibidores de canales de calcio y vías de señalización intracelular.

El día experimental, donde los cultivos se caracterizaron por presentar un estado óptimo con respecto a la disposición de los miotubos y la morfología de estos, las células se lavaron tres veces con PBS y se añadió por pocillo 0,5 mL de medio de cultivo sin suero (medio base (DMEM)), a excepción de experimentos que partan de una cantidad mayor o menor de efluente final, para recolectar la secreción de IL-6. En el medio presente en cada pocillo se añadieron diferentes agonistas, antagonistas o combinación de ambos dependiendo del protocolo experimental establecido durante un tiempo de incubación de 2 horas; estos experimentos se acompañaron de controles negativos y positivos para la valoración de IL-6 en condiciones basales y en presencia o ausencia de estímulos o inhibidores ensayados. Cabe destacar la adición de inhibidores 15 min previos a la aplicación del estímulo, siendo esta forma de actuación necesaria para evitar competitividad entre inhibidores y estímulos por la misma diana de actuación.

Una vez transcurrido el tiempo estimado de incubación se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se alicuotaron como muestras independientes identificando su condición experimental; posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Para llevar a cabo una normalización de la secreción, una vez retirados los efluentes, se adicionó al cultivo Hoechst 33342 (ThermoFisher) y se incubó durante 40 minutos para poder lograr un marcaje de los núcleos y llevar a cabo un conteo de estos. A través del microscopio automático EVOS y el software dedicado se tomaron imágenes para que se sometieron a un conteo y análisis por medio del software FIJI. La secreción se normalizó por cada 100000 núcleos.

Los efluentes obtenidos y almacenados se analizaron a través de la técnica ELISA mediante el kit específico Elisa Pro Human IL-6 (MABTECH). El fundamento de esta técnica se basa en dos componentes esenciales, el antígeno de estudio a cuantificar y un anticuerpo específico para ese antígeno conjugado a una enzima que genera una reacción

cuantificable. Se usó un Elisa de tipo sándwich. Este tipo de Elisa utiliza dos anticuerpos específicos contra el antígeno para capturarlo a manera de emparedado (sándwich) en la placa.

En primera instancia se realizó un pretratamiento de la placa destinada al Elisa añadiendo el anticuerpo de captura diluido en PBS (0,5µg/mL), sellando la placa e incubándola ON a 4°C. Transcurrido el periodo de incubación se sometió a tres lavados con el buffer de lavado (PBS + 0,05% Tween20) (proceso a repetir tras la incubación con cada reactivo o anticuerpo del kit) y se bloqueó con el buffer de incubación (PBS+0,05% Tween20+0,1% BSA) durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente y sellada. Tras el lavado para retirar el exceso de buffer de bloqueó se procedió a la adición de las muestras y la curva patrón.

Se partió de un estándar de Elisa el cual contenía un liofilizado de IL-6, siendo esta la solución madre, la cual se reconstituyó agregando 1mL del tampón de reconstitución estándar (1µg/ml) 30 minutos previo a su uso congelando la solución madre sobrante a -20°C. Una vez transcurrido el tiempo indicado se preparó la curva patrón a partir de la solución madre reconstituida realizando diluciones seriadas tomando como diluyente el buffer de incubación o *Elisa diluent* (Figura 12).

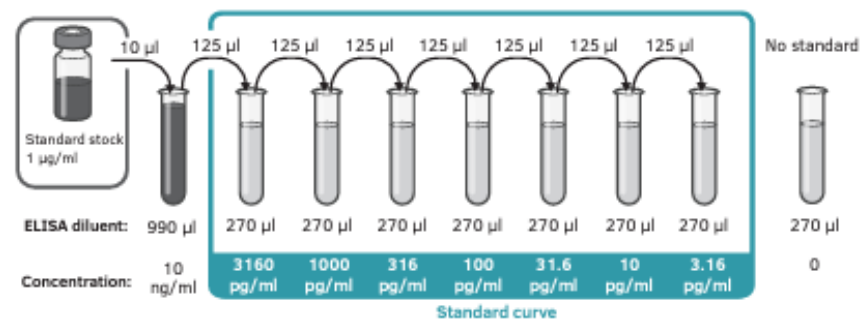


Figura 12. Diluciones seriadas. Elisa Pro Human IL-6 (MABTECH). Fuente: Mabtech.

Estas diluciones se colocaron en la placa (1-7 + blanco) por duplicado, al igual que todas las muestras de estudio estableciendo un cuadrante de posición para identificar a la hora del análisis cada una de las muestras (a través de las propias etiquetas de identificación de los viales congelados); tanto las muestras como la curva patrón se incubaron selladas durante 2h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se procedió a los lavados con el buffer de lavado y la adición del anticuerpo de detección biotinilado diluido previamente con el buffer de incubación (1µg/ml) y se incubó durante 1h a temperatura ambiente con la placa sellada. Se retiró el excedente del anticuerpo de detección con los lavados y se adicionó la estreptavidina-HRP previamente diluida 1:1000 durante 1h a temperatura ambiente con la placa sellada. La estreptavidina conjugada con HRP consta de una proteína de estreptavidina que se conjuga de forma covalente a la enzima de peroxidasa de rábano picante (HRP); la estreptavidina se une a la biotina y la HRP conjugada proporciona la actividad enzimática para la detección. Esto permite la

conjugación del anticuerpo secundario (anticuerpo de detección biotinilado) con la enzima (estreptavidina-HRP).

Tras la incubación y sus respectivos lavados se agregó TMB (tetrametilbenzidina), siendo el sustrato cromogénico que reacciona con la peroxidasa de la estreptavidina-HRP escindiéndolo y emitiendo así coloración, durante 15 minutos a temperatura ambiente y placa sellada. Este TMB transcurrido el periodo de incubación emitió una coloración azulada detectable a 370 y 652 nm, la cual tras la adición del ácido sulfúrico (solución *STOP*) cambió a una coloración amarillenta detectable a 450nm. Esta coloración permite hacer una lectura de la placa, a través del lector de placas SPECTRO^{STAR} nano y un software dedicado, a esta longitud de onda y, a través de la curva patrón, calcular los pg/mL de IL-6 que presenta cada una de las muestras (Figura 13).

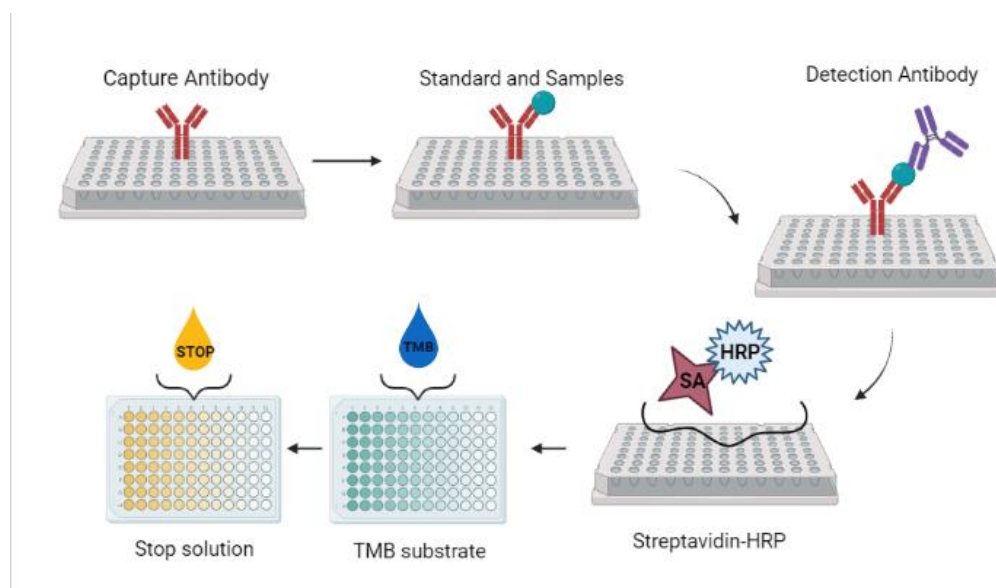


Figura 13. Elisa sándwich (estreptavidina-HRP).

Estudio de las señales de calcio intracelular

La fluorescencia es una propiedad de algunas moléculas de absorber longitudes de onda específicas y poder liberar energía emitiendo luz a una longitud más larga. Esta propiedad ha sido utilizada para producir abundantes compuestos fluorescentes, algunos de ellos sensibles a la concentración de calcio, de forma que cambios en la concentración de este ion se corresponden con cambios en la fluorescencia emitida por estos marcadores lo que permite estudiar la vía de señalización del ion calcio. Uno de los indicadores más utilizados es el fura-2 AM (éster acetoximetil), que posee un grupo éster acetoximetílico (AM) conjugado que le confiere permeabilidad a través de la membrana celular. Una vez en el interior celular, el grupo éster AM es escindido por las esterasas intracelulares y el FURA-2 AM se convierte en su forma fluorescente desesterificada. El FURA-2 AM es un indicador ratiométrico con dos longitudes de onda de excitación, una a 340nm y otra a 380 nm, y una longitud de onda de emisión a 510nm. El cociente o ratio entre ambas fluorescencias (F340/F380) es usado como índice de la concentración de Ca^{2+} ,

siendo la emisión a 380 nm la más sensible a cambios en la concentración de Ca^{2+} , mientras que la de 340nm apenas es modificada. Este cálculo radiométrico permite diferenciar cambios reales en la concentración de calcio de posibles artefactos experimentales, movimientos de células o cambios en la fluorescencia del Fura2-AM provocados por drogas utilizadas en los diferentes experimentos. (Pan et al., 2012, Poenie, 1986).

En nuestro estudio las células musculares esqueléticas se cultivaron sobre cristales en placas estériles (Cristales 24mm) pretratados con colágeno (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 90-120 min). Tras retirar el medio de diferenciación y lavar el cultivo con PBS, se incubaron con una solución de fura-2 AM (5 μM) (en medio base con Cremophor (0,01%)) durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras retirar este medio, se lavó y se añadió medio base limpio (sin suero). Los cristales con las células ya cargadas no se utilizaron hasta al menos 12 minutos después de la retirada del Fura-2AM, tiempo durante el cual tuvo lugar la desesterificación.

Una vez desesterificadas, se procedió a registrar a lo largo del tiempo los cambios en la fluorescencia intracelular mediante la técnica de microscopía *Imaging*, lo que permitió cuantificar los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular cuando las células fueron tratadas con estímulos y/o inhibidores de las diferentes vías de señalización estudiadas. Para esto cada cristal (con miotubos diferenciados) se montó en una cámara soporte o de perfusión. La cámara se colocó sobre la platina de un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon TE2000); las células se sometieron inicialmente a un flujo continuo y regulado (1mL/min) de solución Tyrode (Tabla 5), y tras elegir un campo con miotubos se procedió a adquirir imágenes a lo largo del tiempo (cada 1s, 0.8s o 5 s, según el protocolo experimental diseñado). Las diferentes drogas se perfundieron a través de un sencillo sistema de jeringas que por gravedad permitió ir aplicando los diferentes estímulos e inhibidores.

Mediante el software Metafluor (Universal Imaging) se adquirieron y grabaron secuencialmente las imágenes de fluorescencia de emisión a 340 y a 380nm, para su posterior procesamiento y análisis. Este análisis se realizó mediante el procesador de imágenes Fiji (*imageJ*), generándose primero una imagen de ratio (cociente entre las imágenes obtenidas a 340nm y 380nm cada 1s, 0.8s o 5s) donde se cuantificó la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo (F340/F380). Estos cambios en el ratio de fluorescencia se corresponden con cambios a tiempo real de la concentración de calcio intracelular [Ca^{2+}]_i. Cada valor de ratio se normalizó respecto a un valor medio de ratio basal o inicial en ausencia de estímulos e inhibidores. Se calculó el pico o incremento máximo en la respuesta a ATP, KCl y se calculó el área bajo la curva cuando se vaciaron los depósitos de Ca^{2+} con TPS.

Se empleó el análisis de varianza de una vía (SPSS) y un test de Tukey para el estudio del efecto de los diferentes factores discretos (día o fase de cultivo) sobre las respuestas. $P < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.005$ (***) fueron los niveles de significación.

	PM	mM
NaCl	58,44	13.7
KCl	74,56	0,54
MgCl ₂		100 mM
HEPES	238,3	1
NaH ₂ PO ₄	170	0,04
Glucosa	180,16	5,6
NaHCO ₃	84,01	2,2
CaCl ₂		1,8
EGTA		1

Tabla 5. Solución Tyrode

Extracción y aislamiento del músculo *Flexor Digitorum Brevis (FDB)*

Modelo animal

Para evaluar la participación de los canales operados por voltaje y *panx-1* en la entrada de calcio acoplada a excitación (ECCE) se usó un modelo experimental de ratones C57BL/6 adultos machos (6-8 semanas -young-) y ratones C57BL/6 longevos machos (24-29 semanas -aged-) obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Estos animales de experimentación fueron mantenidos bajo condiciones de temperatura y humedad controlada, ciclos de luz-oscuridad de 12 hora y comida y agua *ad libitum*.

Eutanasia y extracción de extremidades

El manejo y traslado de animales a las instalaciones habilitadas para su praxis dentro de la unidad de investigación (Departamento de Fisiología del músculo) se llevó a cabo según los protocolos establecidos por la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioética de la Facultad de Medicina (Chile)

La técnica empleada para eutanasiar a los animales fue la dislocación cervical. El animal se colocó en decúbito prono sobre una superficie de rejillas hasta conseguir una postura adecuada; posteriormente, se sujetó al animal con ayuda de unas pinzas en la región cervical ejerciendo presión para, con ayuda de la otra mano, tirar de la cola y provocar la separación de las vértebras cervicales con el cráneo; confirmando posteriormente que dicha separación fue exitosa.

Una vez eutanasiado, se procedió a la separación de las patas posteriores con material quirúrgico previamente esterilizado. La retirada de la piel es necesaria para facilitar la visualización de los tendones y la posterior extracción del músculo Flexor Digitorum Brevis (FDB), músculo objeto de estudio. Este procedimiento se realizó a través de un corte cutáneo a la altura de la cadera del animal, para ir diseccionando alrededor de la masa muscular y poder extraer la extremidad de la forma más limpia posible

traccionando hasta la articulación del tobillo para posteriormente retirar la piel desprendida. Se amputó a la altura de la rodilla y, ambas extremidades se colocaron sobre una placa con tampón fosfato salino (PBS).

Disección del músculo Flexor Digitorum Brevis (FDB)

Las extremidades amputadas fueron depositadas sobre una placa de 60mm de diámetro con PBS, previamente tratada con resina de Silgar que permite inmovilizar la pieza anatómica mediante alfileres y/o agujas. La extracción del FDB se llevó a cabo bajo disección con lupa binocular Nikon SMZ800 colocando y fijando la extremidad con la superficie plantar hacia arriba. Se retiró la piel sobrante de la zona plantar y el tobillo se identificó el músculo FDB, insertado en un tendón a nivel proximal, ramificándose hacia la zona distal donde se encuentran los dedos. Posteriormente, se seccionó el músculo a nivel del tendón de inserción proximal evitando los vasos sanguíneos que discurren por la zona medial.

Aislamiento fibras musculares del músculo Flexor Digitorum Brevis (FDB)

El aislamiento de fibras musculares se realizó mediante digestión enzimática del músculo con Colagenasa II de Worthington Biochemical (Lakewood, NJ, USA, 1.3 mg/ml (400 U/ml)) en medio de cultivo DMEM el músculo *FDB* diseccionado se sumergió en la solución de colagenasa y se incubó en un baño termostático durante 90 minutos a 37°C. Estos tiempos se fueron incrementando proporcionalmente cuando las edades los individuos eran superiores a las 6-8 semanas.

Finalizado el tiempo de digestión los músculos se depositaron en placas con medio DMEM 10% HS para su disgregación mecánica. Ésta se llevó a cabo haciendo pasar el tejido muscular a través de pipetas Pasteur de vidrio de diferentes calibres. Se inició la disgregación con la pipeta de mayor calibre y cuando las fibras musculares se soltaban se retiraban a una placa con DMEM 10% HS, desechándose los restos celulares y de tejido conectivo procedentes de la digestión. Fue necesario ir reponiendo medio limpio a la preparación y evitar la formación de burbujas de aire, ya que dañarían nuestras fibras de estudio. Se repitió el proceso con los diferentes calibres de pipeta, pasando a calibres más pequeños a cuando los músculos ya no mostraban resistencia al pipeteo. (Figura 14).

A continuación, las fibras musculares se sembraron en cubreobjetos (25mm) previamente recubiertos con matriz comercial ECM (Sigma. y secados en un incubador durante 20-30 minutos.



Figura 14. Representación ilustrada del proceso de extracción de las extremidades posteriores y su disección para la retirada del músculo flexor digitorum brevis (FDB) de ratón adulto de la cepa C57BL/6. Se indica una posterior digestión química y mecánica para la obtención de las fibras musculares de estudio.

Tras la siembra homogénea de las fibras s en las placas con los cubreobjetos las fibras reposaron durante 20 minutos para lograr su óptima adherencia y evitar su desprendimiento de la matriz de adhesión. Transcurrido ese tiempo se añadió medio DMEM 10% HS a las placas Petri y se incubaron a 37° C (y CO₂ 5%) durante las 18-24h previas a su utilización (Buvinic et al., 2009; Casas et al., 2019; Arias-Calderón et al., 2016).

CUANTIFICACIÓN DE LA ENTRADA DE MN²⁺

El manganeso (Mn²⁺) es un ion capaz de atravesar la membrana plasmática a través de los mismos canales de calcio sensibles a voltaje de las fibras musculares. Se estudió la entrada de manganeso como método para evaluar la participación de los canales operados por voltaje (Ca_{v1.1}) en la entrada de calcio acoplada a excitación (ECCE) a través de la técnica *quenching de manganeso* o *apagamiento por manganeso*. Esta herramienta permite evaluar la entrada de cationes divalentes desde el medio extracelular, debido a la propiedad que éstos tienen de reducir o extinguir la luz emitida por sondas fluorescentes (Gach et al., 2008).

Para este estudio se utilizó la molécula fluorescente Fura 2AM (éster de fura-2-acetoximetilo) un indicador de calcio ratiométrico, que permite medir las concentraciones de calcio intracelular cuando es excitado a 340nm y a 380nm (Em 510 nm). La emisión del

Fura-2AM a 357/7nm (Em510) (no sensible a calcio) se reduce cuando el Mn^{2+} se une a la sonda fluorescente (*quenching*), por lo que la reducción de la fluorescencia registrada se debe a la entrada de Mn^{2+} al interior celular a través de los mismos canales que el ion calcio. Esta técnica permite evaluar indirectamente la entrada de Ca^{2+} en el músculo esquelético por la mayor afinidad del Fura-2AM a Mn^{2+} que a Ca^{2+} , por la entrada de Mn^{2+} por rutas similares al Ca^{2+} y por la inexistencia de depósitos internos de este ion.

Durante los experimentos de *quenching* las fibras musculares aisladas, se incubaron con Fura-2 AM (5 μ M) en una solución Krebs-Ringer (Tabla 5) durante 45min a temperatura ambiente; posteriormente, la preparación se lavó 3 veces con Krebs Ringer Mn^{2+} (K^+ 5mM) (Tabla 6). Tras los lavados la preparación se puso en KR Mn^{2+} (1mM) con diferentes concentraciones de K^+ según el experimento diseñado (3mM K^+ , 5mM K^+ o 7mM K^+) (Tabla6). En los casos en los que se aplican inhibidores (NIF, MP2) o un estímulo (ATP), se usó la solución de Krebs-Ringer Mn^{2+} (5mM K^+).

En todos los casos la preparación fue tratada con N-bencil-p-toluenosulfonamida (BTS) (5 μ M) durante 15 minutos. El BTS es un inhibidor selectivo de la actividad ATPasa del músculo esquelético y por lo tanto de la contracción muscular, que reduce posibles artefactos como movimiento de las fibras al ser estimuladas en las diferentes condiciones experimentales.

Tras la incubación, las fibras aisladas se estimularon eléctricamente a través de un dispositivo electro estimulador GRASS S48 (Axon instruments), aplicando un protocolo con 270 pulsos, con una duración de 0.3 ms por pulso, a baja frecuencia (20Hz) o alta frecuencia (90Hz) (Gach et. al, 2008; Jorquera et al., 2013). La electroestimulación de las fibras se aplicó mediante un electroestimulador de horquilla, formado por dos electrodos de platino con una distancia entre ellos de \sim 1 mm.

Para estudiarla fluorescencia se utilizó un filtro de excitación de 357/7 nm y uno de emisión de 510/8 nm (Microscopio Carl Zeiss Axiovert 135M) a través del software LSM Microsystems.

Las imágenes obtenidas fueron procesadas a través del software Fiji (Imagen J) y se cuantificaron los cambios en la fluorescencia en cada una de las fibras musculares elegidas ($\Delta F/F_0$) a lo largo del tiempo.

	Concentraciones
NaCl	145 mM
KCl	5 mM
Mg₂Cl	1 mM
CaCl₂	1 mM
Glucosa	5,6 mM
HEPES	10 mM

Tabla 6. Krebs-Ringer.

	KR Mn ²⁺ 1mM K ⁺	KR Mn ²⁺ 3mM K ⁺	KR Mn ²⁺ 5mM K ⁺	KR Mn ²⁺ 7mM K ⁺
NaCl	149 mM	147 mM	145 mM	143 mM
KCl	1 mM	3 mM	5 mM	7 mM
Mn₂Cl	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
MgCl₂	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
Glucosa	5.6 mM	5.6 mM	5.5 mM	5.5 mM
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM

Tabla 7. Krebs-Ringer Mn²⁺.

Western blot

La técnica de Western Blot es empleada para la determinación e identificación de proteínas de interés en muestras, extractos celulares o tejidos. Este método se basa en la separación de proteínas de interés, en función de su peso molecular, a través de un campo eléctrico; estas son transferidas a la superficie de una membrana y expuestas a anticuerpos específicos frente a las proteínas de estudio para un posterior revelado y análisis cualitativo y/o cuantitativo.

Lisado celular

Como punto de partida, el cultivo de estudio se sometió a estímulos o inhibidores de interés, según el objetivo experimental, durante 2 horas. Tras este tiempo se procedió a la lisis celular para la liberación del contenido proteico, proceso que debe llevarse a cabo en frío (sobre hielo) para evitar la proteólisis y desnaturalización proteica. Para el lisado celular se retiró el medio de diferenciación y se lavó el cultivo con PBS para retirar el residuo proteico del suero y restos de las drogas de estudio. Posteriormente se agregó al cultivo la solución de lisis NP40 (Tabla 8) y se levantó el cultivo con un raspador celular con el fin de lisar la totalidad de las células en crecimiento.

La muestra lisada fue recogida y sonicada (2 pulsos, 4s) con un tiempo de espera entre ambos pulsos de 15min. Posteriormente se centrifugó a 16100g durante 15 minutos a 4°C (con el fin de eliminar los restos celulares y obtener un sobrenadante donde se encuentren las proteínas de estudio. Al sobrenadante se le añadió Laemmli buffer (LB)

(Tabla 9), enriquecido con ditioneitol (DTT) para su posterior resolución en un gel SDS-PAGE (SodiumDodecyl Sulfate Poliacrilamide Gel Electrophoresis).

Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se usó el BCA Protein Assay Kit. El ácido bicinónico (sal sódica), es un compuesto capaz de unirse con los iones Cu^+ producidos cuando las proteínas reaccionan al Cu^{2+} en un medio alcalino (reacción de Biuret). Cuando el ácido bicinónico se une al Cu^+ , toma una coloración púrpura que hace que el método sea rápido y sencillo de medir

Para determinar la concentración de proteínas se pusieron los diferentes lisados celulares, en una placa de 90 pocillos (5 μl /pocillo, duplicados). Se incluyeron también dosis crecientes de BSA (0,2-0,3-0,5-0,7-1-1,5-2 mg/mL) para obtener una curva estándar. En cada pocillo se añadió una solución mezcla de dos reactivos: reactivo A (Cooper II: solución de sulfato (Sigma-Aldrich)) y reactivo B (Solución de ácido bicinónico (Sigma), mezclados en proporción 1:50. La placa se incubó a 90°C durante 15 minutos, tiempo necesario para que se de un producto coloreado que se midió mediante un lector de placas SPECTRO^{STAR} nano a través de un software dedicado (Ex 540nm).

Electroforesis

Una vez que las proteínas fueron extraídas y cuantificadas, se añadieron a las muestras Laemmli buffer con dodecilsulfato sódico (SDS), consiguiendo así, una conformación que facilita que estas proteínas se muevan en el gel únicamente por su tamaño. Para lograr una desnaturalización total de las proteínas, se calentaron durante 5 minutos a 95 GRADOS en un termobloque. La electroforesis se llevó a cabo mediante un gel de carga (4% de acrilamida) (Tabla 10) y un gel separador (10% acrilamida) (Tabla 11). que se sumergieron en una cubeta de electroforesis con un tampón de migración (Running buffer) (Tabla 12) el cual permitió el paso de la corriente eléctrica en las condiciones establecidas.

Las muestras de estudio se depositaron en los pocillos de gel de carga, poniendo en cada pocillo la misma cantidad de proteínas (25-30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ muestra) y anotando el orden de estas para su posterior identificación y estudio comparando los resultados de las diferentes calles. Para que fuese posible la identificación del tamaño de las proteínas de estudio se utilizó un marcador de peso molecular (PONER MARCA). Una vez cargado se conectó a la fuente de energía asegurando la ubicación correcta de los polos; esto provoca el movimiento de las proteínas hacia el polo positivo, aplicando un voltaje de 30mA por gel durante 60 minutos.

Transferencia semiseca

A continuación, se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia semiseca. Para ello se preparó el “sándwich” de transferencia con cuatro capas de blotting paper de 10x10 cm² previamente humedecidos con blotting buffer (Tabla 13). Encima del blotting paper se colocó la membrana de nitrocelulosa y sobre esta, el gel de acrilamida asegurando un completo contacto a la membrana, sin burbujas entre ellas, cerrando este “sándwich” con otras cuatro capas de blotting paper. La ausencia de burbujas es de vital importancia para una transferencia correcta a la membrana. Al ser una transferencia semiseca solo se añadió un pequeño volumen de blotting buffer a la cubeta aplicando 80 mA por cada membrana durante 2 horas.

Incubación de anticuerpos y revelado

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, es de suma importancia verificar si el proceso de la electroforesis se ha dado correctamente; para ello la membrana se incubó con solución de Ponceau, que tiñó las proteínas transferidas de forma reversible. Esta solución fue lavada con TBST (Tabla 14A-14B).

La membrana se bloqueó posteriormente con una solución de bloqueo (5% BSA+ TBS) a temperatura ambiente y en rotación (50 rpm) durante 1 hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario elegido (5% BSA) según proteína de estudio durante 2h en las mismas condiciones (temperatura ambiente en rotación) (Tabla 15). Transcurrido ese tiempo se realizaron seis lavados de cinco minutos con rotación (100rpm) para una incubación posterior con el anticuerpo secundario de interés, en las mismas condiciones al anticuerpo primario, durante 1h y se retira mediante 6 lavados de 5 min con rotación (100rpm).

Una vez completado el proceso de incubación con anticuerpos las membranas se incubaron con la solución de revelado quimioluminiscente (SuperSignal™ West Dura) la cual está compuesta de Luminol/Enhancer y Stable Peroxide buffer. Esta solución se añadió en proporción 1:1 hasta cubrir la membrana durante cinco minutos y se colocó en el equipo de revelado (LICOR) que permitió recoger las imágenes de quimioluminiscencia (software Image Studio). La cuantificación de los resultados se realizó por densitometría usando el programa Fiji (ImageJ, NIH).

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris Base	40 mM
NaCl	274 mM
Glicerol	20%
Igepal CA-630	2%
EDTA	4mM

Tabla 8. Buffer de lisis NP40.

Reactivos	
Tris Base	4,25g
Glicerol	50mL
Bromofenol	0,01g
SDS	10g
Complementación LB 5X	
LB 5X	600µL
DL-1,4-Dithiothreitol (DTT)	200 µL
2-Mercaptoetanol	200 µL

Tabla 9. Preparación de Laemmli buffer (LB 5x)

	10mL
APS (µl)	166µl /ml
H2O (ml)	6,22ml
ACRILAMIDA (ml)	1ml/ml
SOLUCIÓN D (Tris Base 0,5M) (ml)	2,5ml/ml
SOLUCIÓN C (SDS 10%m/v) (µl)	100µl /ml
TEMED (µl)	10µl /ml

Tabla 10. Gel de carga (4%)

	20mL
APS (μl)	167 μ l /ml
H2O (ml)	9,62ml
ACRILAMIDA (ml)	5ml
SOLUCIÓN B Tris Base 1,5M) (ml)	5ml/ml
SOLUCIÓN C (SDS 10%<i>m/v</i>) (μl)	200 μ l /ml
TEMED (μl)	10 μ l /ml

Tabla 11. Gel de separación (10%)

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Tris Base	124 mM
Glicina	1,26 M
SDS	0,5 %

Tabla 12. Running buffer (5X).

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris base	25mM
Glicina	150mM
MeOH	20%

Tabla 13. Blotting buffer.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Tris Base	200mM
NaCl	1,37M

Tabla 14A. Tris Buffer Saline (TBS) (10X)

	Reactivos (1L)
Tween 20 (0,1%)	1 mL
TBS (10)x	100 mL

Tabla 14B. Tris Buffer Saline con Tween20 (TBST)

ANTICUERPOS PRIMARIOS	CONCENTRACIÓN	ANTICUERPOS SECUNDARIOS
Anti-Actin Antibody (rabbit, Sigma)	1:2000	Anti-rabbit IgG (Goat, Jackson)
Anti-Cav _{1.x-α1} Antibody (mouse, Sigma)	1:500	Anti-mouse IgG (Goat, Jackson)

Tabla 15. Anticuerpos de estudio Western Blotting.

Transfección

En este estudio se realizaron transfecciones con el propósito de silenciar determinados genes y estudiar el efecto de ese silenciamiento sobre la señal de Ca²⁺ intracelular.

Se partió de cultivos en placas de 6 pocillos con un estado de diferenciación óptimo. Estos cultivos fueron sometidos a lavados para retirar el exceso de suero y se establecieron dos grupos experimentales, control y tratamiento (*shOrai1*). A ambos grupos se les añadió 1,75 mL de medio base sin suero; posteriormente al grupo control se le adicionó un preparado que contenía 250 µL de medio base y 9 µL de Dharmafect, siendo este el reactivo de transfección; al grupo tratamiento (*shOrai1*) se le adicionó un preparado con 250 µL de medio base, 9 µL de Dharmafect y 4 µg del plásmido *shOrai1* (Addgene). La secuencia sentido *shOrai1* fue 5'-CACCTCACTGGTTAGCCATAAGACGAATCTTATGGCTAACCACTGA-3', y la secuencia antisentido fue 5'-AAAACCTTTACACGCTAGATGGTTTGCTCTTATGGCTAACCACTGA-3'.

Estos cultivos se incubaron durante 5h para, posteriormente, se les retiró el efluente y se añadió medio de diferenciación. Transcurridas 48h tras la transfección se procedió a determinar las señales de Ca²⁺ intracelular para corroborar si la transfección ha sido exitosa.

Expresión del gen IL-6

Para poder evaluar la expresión del gen de la IL-6 se realizó la extracción de ARN del cultivo primario de estudio, con un estado de diferenciación y una morfología óptima, a través del kit II de ARN total EZNA (Omega Bio-Tek, Madrid, España); posteriormente se realizó una transcripción inversa o retrotranscripción (Kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad, ThermoFisher, Madrid, España). Se determinó la expresión del gen de IL-6 y de GAPDH (usado como gen constitutivo). Se empleó la RT-PCR utilizando sondas Taqman con números de acceso Hs00174131_m1 para IL-6 y Hs02758991_g1 para GAPDH (ThermoFisher, Madrid, España). Los niveles de expresión del ARN para IL-6 se normalizaron respecto a los niveles de GAPDH siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando muestras basales no estimuladas como calibrador (Livak et al.,2001).

Estadística

Los datos se presentan en forma de media \pm error estándar de la media (sem). Para el contraste de hipótesis se empleó la t de Student para comparar dos grupos experimentales, pareada o no según el diseño de los experimentos. Cuando los datos no eran normales se transformaron antes de su análisis tomando el log10; si aun así persistía la no normalidad se empleaba la prueba U de Mann-Whitney. Para estudiar diferencias de varios grupos al mismo tiempo se empleó el análisis de varianza (ANOVA), de una o dos vías y con o sin medidas repetidas en función del diseño experimental. Se comprobaba siempre la homoscedasticidad de los datos, transformándose (normalmente log10 o raíz cuadrada) en caso de no cumplirse. Para evaluar posteriormente las diferencias entre grupos concretos empleamos contrastes planeados a priori (test LSD).

Para el ajuste de exponencial negativa usamos ajuste no lineal limitando siguiendo la ecuación $Y=(Y_0 - \text{Plateau}) * \exp(-1/\tau * X) + \text{Plateau}$

(X - tiempo, Y_0 - valor al inicio de la caída, Plateau – valor al final de la caída, τ – Tau, constante de tiempo Tau tiempo al que el valor de la variable ajustada se reduce a $1/e \cong 0.368$).

Para ajustar exponencial negativa doble o de dos fases se usó la ecuación:

$Y = \text{Plateau} + \text{SpanFast} * \exp(-1/\tau_{\text{Fast}} * X) + \text{SpanSlow} * \exp(-1/\tau_{\text{Slow}} * X)$, donde

$\text{SpanFast} = (Y_0 - \text{Plateau}) * \text{PercentFast} * .01$ y $\text{SpanSlow} = (Y_0 - \text{Plateau}) * (100 - \text{PercentFast}) * .01$

(X – tiempo, Plateau – valor al final de la caída, Y_0 – valor al inicio de la caída, SpanFast – caída inicial o rápida, τ_{Fast} – Tau de la fase inicial o rápida, SpanSlow – segunda fase de la caída, τ_{Slow} – Tau de la fase final o lenta, PercentFast – porcentaje de la caída total debida al componente o fase rápida)

Para el análisis de los datos de microscopía de fluorescencia de fura-2 se ha usado el software libre ImageJ2, en su distribución FIJI (Schindelin et al., 2012), empleando una macro supervisada para generar una imagen de ratio de fluorescencia (F340/F380) a partir de las imágenes de fluorescencia de 340 y 380 nm.

RESULTADOS. CAPÍTULO I

RESULTADOS

Proliferación de cultivos celulares

El estudio partió inicialmente de cultivos primarios de músculo esquelético humano procedentes de 6 individuos adultos >60 años, 5 individuos jóvenes < 60 años. Estos cultivos se sembraron en torno a 3500-4000 células/cm². Como puede observarse en la Figura 15, no se observó que la edad redujera la velocidad de proliferación, sino al contrario, tras 4-6 días era mayor en el caso de los cultivos procedentes de individuos jóvenes.

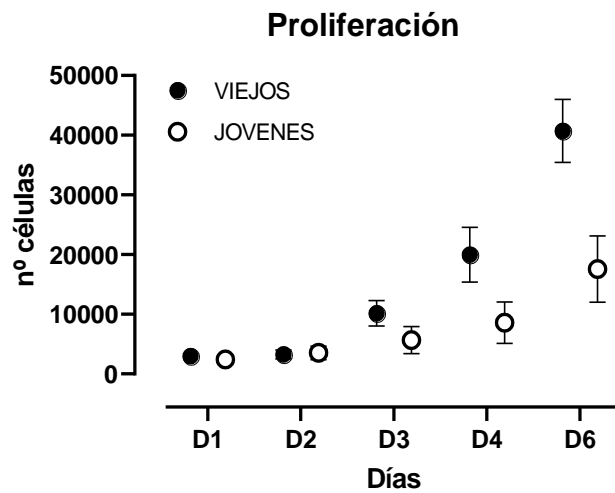


Figura 15. Proliferación de mioblastos humanos procedentes de individuos de dos grupos de edad. n=11

Secreción de IL-6. Estímulos (dosis-respuesta)

Para evaluar la existencia de posibles diferencias en la liberación de IL-6 en función de la edad, estudiamos en cultivos de cada donante varios estímulos de forma paralela y a diversas concentraciones (figura 16).

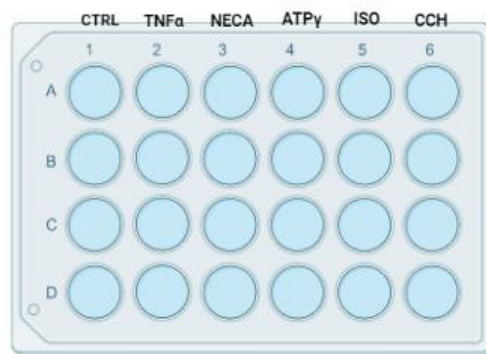


Figura 16 Diseño de placa de cultivo para el estudio de secreción de IL-6 en cultivos humanos de músculo esquelético.

El rango de concentración para los diversos estímulos está basado en la literatura previa, buscando estimar la respuesta óptima (Figuras 17 y 18)

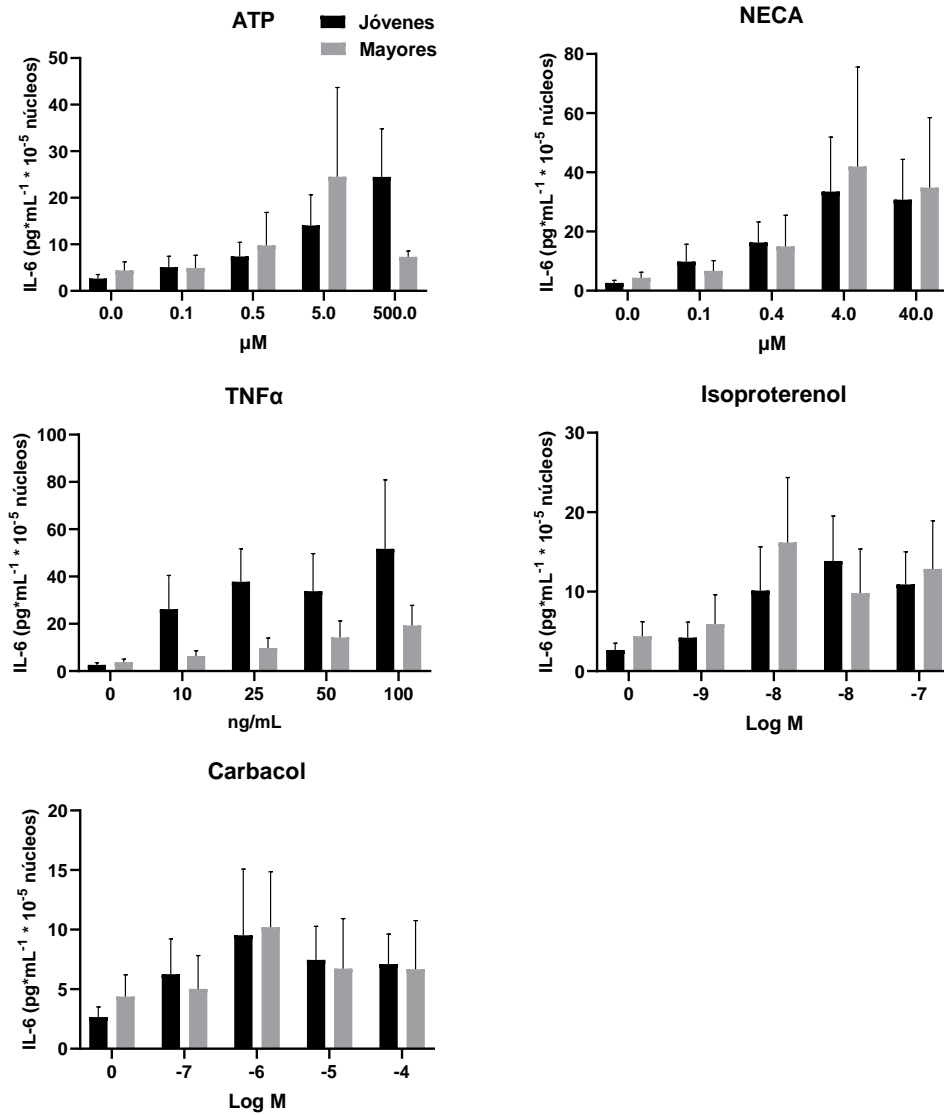


Figura 17. Secreción de IL-6 en respuesta a la estimulación (2 horas) con concentraciones crecientes de diferentes estímulos: 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA); isoproterenol (ISO); carbacol (CCh).

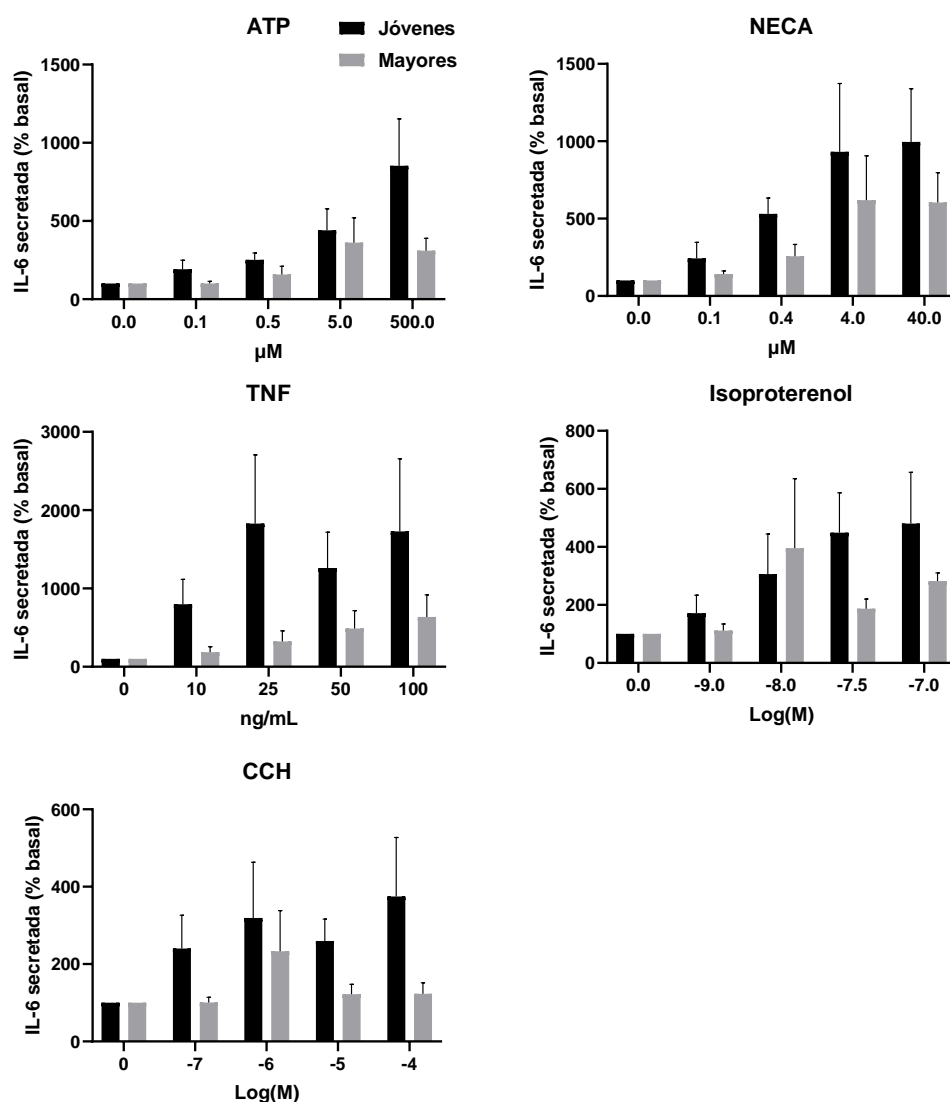


Figura18. Secreción (Datos porcentuales respecto a secreción basal) de IL-6 en respuesta a la estimulación (2 horas) con concentraciones crecientes de diferentes estímulos. 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA); isoproterenol (ISO); carbacol (CCh).

Como puede observarse en las Figuras 17 y 18 no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de edad, a pesar de que en algunos puntos concretos y para el estimulante TNF α se podía observar una tendencia a una mayor secreción en el caso de los cultivos procedentes de individuos mayores. El análisis de varianza de las curvas dosis-respuesta mostró de manera sistemática falta de efecto del factor Edad, además de una apreciable variación entre individuos, como puede observarse en la tabla adjunta.

	ABSOLUTOS		NORMALIZADOS	
	TNF α		TNF α	
Interacción	F (4, 32) = 1.247	P=0.3108	F (4, 32) = 1.247	P=0.3110
Concentración	F (2.152, 17.22) = 9.311	P=0.0015	F (2.152, 17.22) = 9.329	P=0.0015
Edad	F (1, 8) = 0.1633	P=0.6967	F (1, 8) = 2.182	P=0.1779
Individuo	F (8, 32) = 11.13	P<0.0001	F (8, 32) = 6.016	P<0.0001
	NECA		NECA	
Interacción	F (4, 32) = 0.3600	P=0.8351	F (4, 32) = 0.3582	P=0.8364
Concentración	F (1.533, 12.26) = 8.702	P=0.0067	F (1.535, 12.28) = 8.739	P=0.0065
Edad	F (1, 8) = 0.2046	P=0.6630	F (1, 8) = 0.2643	P=0.6211
Individuo	F (8, 32) = 12.58	P<0.0001	F (8, 32) = 2.709	P=0.0213
	ATP		ATP	
Interacción	F (4, 32) = 0.4420	P=0.7773	F (4, 32) = 0.4377	P=0.7804
Concentración	F (1.888, 15.10) = 9.556	P=0.0023	F (1.882, 15.05) = 9.603	P=0.0023
Edad	F (1, 8) = 0.1165	P=0.7417	F (1, 8) = 1.241	P=0.2976
Individuo	F (8, 32) = 15.68	P<0.0001	F (8, 32) = 2.748	P=0.0198
	ISOPROTERENOL		ISOPROTERENOL	
Interacción	F (4, 32) = 0.3852	P=0.8175	F (4, 32) = 0.3862	P=0.8168
Concentración	F (2.909, 23.27) = 4.910	P=0.0092	F (2.911, 23.29) = 4.927	P=0.0090
Edad	F (1, 8) = 0.3889	P=0.5502	F (1, 8) = 0.1512	P=0.7075
Individuo	F (8, 32) = 11.58	P<0.0001	F (8, 32) = 2.628	P=0.0246
	CCh		CCh	
Interacción	F (4, 32) = 0.9664	P=0.4394	F (4, 32) = 0.9671	P=0.4390
Concentración	F (1.795, 14.36) = 1.044	P=0.3698	F (1.790, 14.32) = 1.043	P=0.3698
Edad	F (1, 8) = 0.08251	P=0.7812	F (1, 8) = 1.216	P=0.3022
Individuo	F (8, 32) = 10.83	P<0.0001	F (8, 32) = 2.924	P=0.0144

Tabla 15. Resultados del análisis de ANOVA de los datos de las figuras 0.1 y 0.2

De los anteriores datos podíamos concluir que en las condiciones experimentales presentadas en este estudio las posibles diferencias inducidas por la edad en la secreción de IL-6 en cultivos musculares humanos no eran significativas desde un punto de vista estadístico, además de acompañarse de falta de diferencias en la capacidad de proliferación durante la fase inicial del cultivo.

Como consecuencia, al no confirmarse la hipótesis de partida se decidió centrar la investigación en dos objetivos generales: la posible intervención de los diferentes elementos de la señal de Ca²⁺ en la liberación de IL-6 en respuesta a ATP y determinar posibles diferencias en la señal de Ca²⁺ en función de la edad, dado que el envejecimiento es conocido por modificar esta vía de señalización en diferentes tipos celulares (citado anteriormente en la introducción).

Aunque por sus efectos se ha atribuido a los cambios en miocinas diversos rasgos del envejecimiento (Oudbier et al., 2022), los estudios sobre su relación con la edad no son totalmente concluyentes (Barros et al., 2022). Los estudios observacionales de pequeño tamaño muestral en humanos muestran un ligero incremento de la IL-6 basal aproximadamente alrededor de la sexta década de vida (McKane et al., 1994; Kania et al., 1995; Hager et al., 1994; Wei et al., 1992), confirmado en un estudio mayor (Ferrucci et al., 2005). En un estudio en una cohorte de mayores de 60 años se ha detectado un incremento de la IL-6 plasmática basal desde la séptima década de edad (Puzianowska-Kuznicka et al., 2016).

El presente estudio requería inicialmente un tamaño muestral de al menos unos 20 donantes de cada grupo de edad para, teniendo en cuenta al menos un coeficiente de variación real de alrededor de un 10% (por la mezcla de variación entre cultivos y la del kit de ELISA), si se pretendía detectar una diferencia de alrededor de un 15% entre los dos tipos de cultivo con una significación estadística de 0.05 (error tipo I 5%) y poder estadístico de 80%. Durante el desarrollo del estudio se encontraron una limitación externa inesperada; la pandemia impidió recibir más muestras de origen quirúrgico, en las que se basa este modelo, con lo que el tamaño muestral se redujo a la mitad del requerido. Sin esta limitación cabría buscar diferencias utilizando condiciones experimentales diferentes, como experimentos a más largo plazo (12-24 horas), exploración de la respuesta de otras miocinas, uso de otros estímulos (estímulo eléctrico, co-cultivo con neuroblastos humanos) o refinar el método de detección. Problemas metodológicos aparte, el tiempo necesario para estos cambios obligó a redefinir en parte los objetivos, incluyendo el estudio del papel de la señal de Ca^{2+} en la secreción y estudiar la propia señal de Ca^{2+} en este modelo.

RESULTADOS. CAPITULO II

RESULTADOS

Los cultivos primarios de músculo esquelético humano se diferenciaron durante un tiempo estimado de 7 a 9 días hasta obtener un cultivo de miotubos multinucleados óptimo y se sometieron a diversos estímulos e inhibidores liberando como respuesta a estos IL-6 al sobrenadante del cultivo. La Figura 19 muestra la secreción de IL-6 producida por el cultivo en respuesta a concentraciones crecientes del agonista del receptor de ATP no hidrolizable (ATP γ S) como del agonista del receptor de adenosina 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA), donde se muestra claramente que ambos indujeron un aumento significativo y dependiente de la dosis en la concentración de IL-6 en el medio de cultivo.

Para poder evaluar el papel de la señalización de Ca²⁺ en la liberación de IL-6, este estudio se centró en las respuestas al ATP debido a su activación de las señales de Ca²⁺ en cultivos de músculo esquelético y su papel clave en las respuestas a la despolarización de membrana y diferenciación de células musculares (Bustamante et al., 2014; Matta et al., 2016).

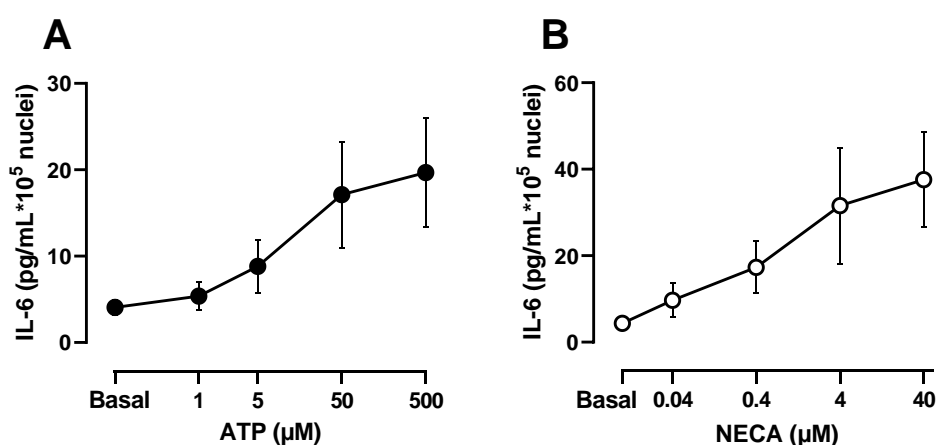


Figura 19. Secreción de IL-6 en células del músculo esquelético humano en respuesta a concentraciones crecientes de ATP γ S (A) y el agonista del receptor de adenosina 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) (B). Media \pm SEM de 9 experimentos independientes de donantes separados.

En diversos tipos celulares las señales de Ca²⁺ intracelular implican un aumento inicial y transitorio de Ca²⁺ en respuesta a su liberación desde depósitos intracelulares seguida de una fase sostenida de menor magnitud asociada con la entrada de Ca²⁺ extracelular. Este evento es una diana interesante de estudio a través de diferentes manipulaciones en sus diferentes componentes. Un enfoque clásico para bloquear la entrada de calcio es el uso de medios con baja concentración de Ca²⁺ (0 Ca²⁺) o con una concentración submillimolar de La³⁺, un bloqueador genérico de los canales de calcio. La figura complementaria S1 muestra un registro de señales de Ca²⁺ intracelular en respuesta al ATP en condiciones control y 0 Ca²⁺. Este registro permitió demostrar que el bloqueo de la entrada de calcio inhibió la fase sostenida de la señal de Ca²⁺ pero no existieron modificaciones en la respuesta máxima inicial, reproduciéndose así el comportamiento esperado de las señales de Ca²⁺ basadas en depósitos de Ca²⁺ intracelulares en ausencia

de una entrada de Ca^{2+} . Por lo tanto, comparamos el control de la respuesta de IL-6 al ATP con las respuestas tanto en ausencia de Ca^{2+} extracelular como en presencia de La^{3+} .

Como se muestra en la Figura 20, existe la respuesta inducida por ATP se inhibió significativamente en ambas condiciones ($p < 0,01$), lo que indica que la entrada de Ca^{2+} durante la estimulación es necesaria para la secreción de IL-6.

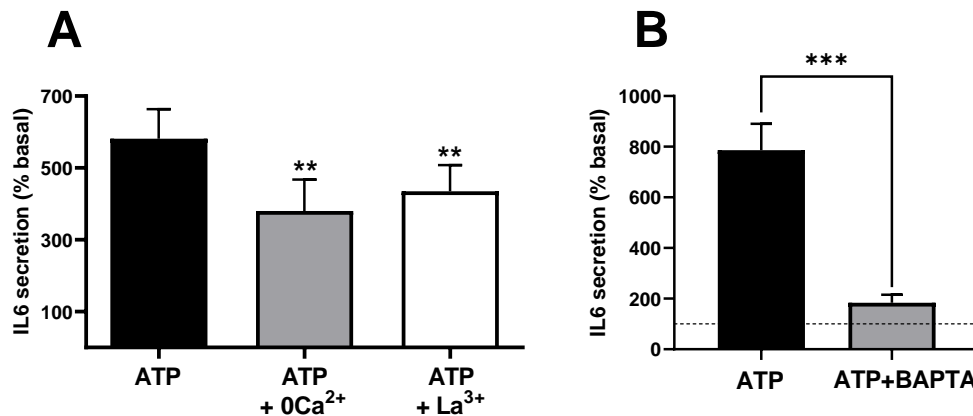


Figura 20. (A) Secreción de IL-6 inducida por ATP en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular (0 Ca^{2+}). O en presencia de La^{3+} (0,1 mM). * $p < 0,01$ frente a control ATP (post-ANOVA; $F = 21,18$, $p < 0,005$) $n = 10-5$ (control y 0 Ca^{2+} – La^{3+}). (B) Efecto del tratamiento del cultivo con el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM en respuesta a ATP γ S. *** $p > 0,005$ (prueba t pareada), $n = 5$. La línea discontinua representa la secreción basal no estimulada.

Uno de los métodos más reconocidos para el bloqueo o reducción de las señales de Ca^{2+} es a través de quelantes de calcio en las células, como EGTA o BAPTA cargados como ésteres de acetoximetilo posteriormente escindidos por esterasas celulares. Esto se puede ver en las señales citosólicas de Ca^{2+} de la Figura 15. Se aplicó ATP 500 μM en medio normal (solución Tyrode que contiene Ca^{2+} 1,8 mM) o en un medio bajo en Ca^{2+} (0 Ca^{2+} añadido más EGTA 1 mM); tras 15 minutos de pretratamiento con el mismo medio (Figura 21A superior). En la Figura 21A inferior se compara la respuesta integrada (área bajo la curva durante 180 segundos, unidades arbitrarias) y la respuesta máxima (DF/F0) de las células representadas en A. *** $p < 0,005$, respecto al ATP, prueba t . La Figura 15B superior representa la respuesta de ATP en células de control y en células cargadas con Bapta-AM (20 min, 10 m). El histograma de la Figura 21B inferior compara la respuesta máxima promedio de las células tratadas y de control. *** $p < 0,005$, prueba t . $n = 25$ (ATP) y 55 (ATP+Bapta) células.

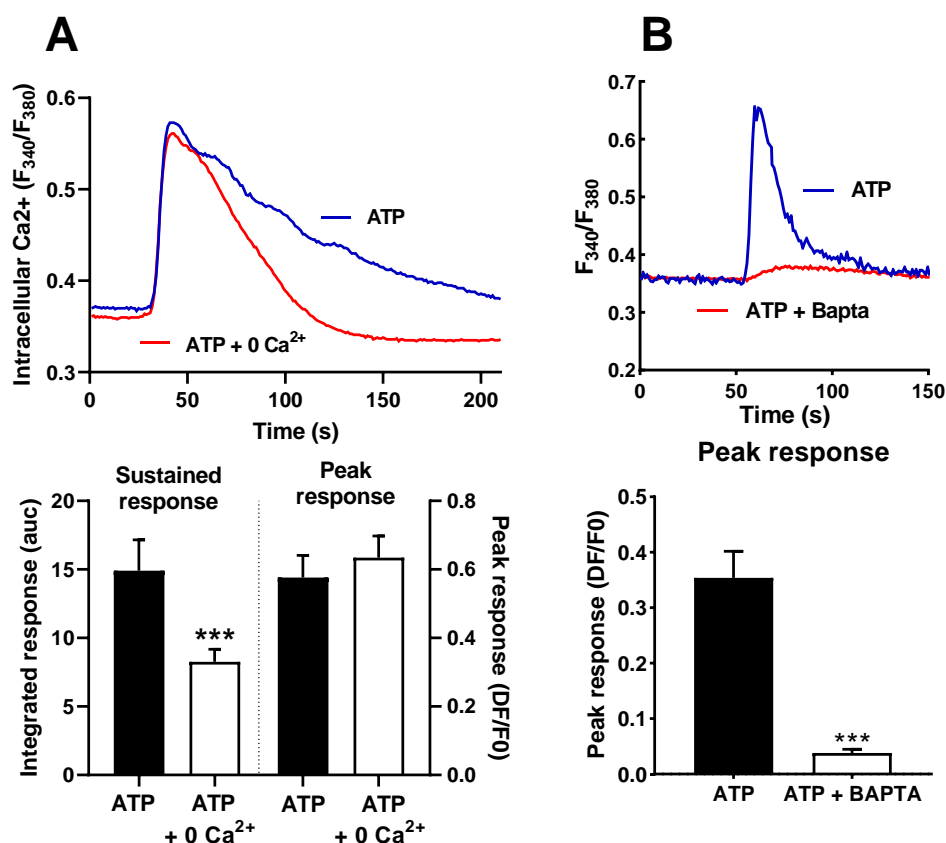


Figura 21. Efecto de la eliminación de Ca^{2+} extracelular en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al ATP. (A) ATP (500 μM) (solución Tyrode (Ca^{2+} 1,8 mM)) y ATP 0Ca^{2+} (EGTA 1mM). Figura inferior compara la respuesta integrada y la respuesta máxima (DF/F0) de las células representadas en *** $p < 0,005$, respecto al ATP, prueba t. (B) ATP y ATP- Bapta-AM. Figura inferior compara la respuesta máxima promedio de las células tratadas y de control. *** $p < 0,005$, prueba t. $n = 25$ (ATP) y 55 (ATP+Bapta) células.

En la Figura 21B se demuestra que en las células cargadas con BAPTA, la estimulación con ATP indujo una fuerte inhibición en términos de liberación de IL-6 ($p < 0,009$), lo que sugiere que la secreción requiere aumentos de Ca^{2+} citosólico. En esta serie de cinco experimentos utilizando células cargadas con BAPTA, la respuesta al ATP aumentó la IL-6 de $6,47 \pm 1,24$ (en reposo) a $11,71 \pm 1,67$ pg/mL $\times 10^5$ núcleos, una respuesta estadísticamente más pequeña ($p < 0,003$, t pareada-prueba) que la respuesta del control emparejado, que fue de $8,84 \pm 1,28$ a $72,04 \pm 12,37$. El hallazgo de que el tampón rápido de Ca^{2+} BAPTA es más eficaz para prevenir la secreción de IL-6 inducida por ATP que el bloqueo del influjo de Ca^{2+} sugiere fuertemente que el Ca^{2+} . La liberación de las reservas intracelulares juega un papel relevante en este proceso.

Los efectos observados en las células cargadas con BAPTA y los observados a posteriori de la inhibición del influjo de Ca^{2+} podrían deberse a la falta de disponibilidad de iones Ca^{2+} en el proceso secretor de IL-6, existiendo la posibilidad de que la secreción en estado basal o no estimulada esté igualmente influenciada. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, ninguno de los procedimientos anteriores inhibió la secreción basal de IL-6. En la Figura 22A se muestra que ni la adición BAPTA, Ca^{2+} a bajas concentraciones o La^{3+} alteraron la secreción en reposo ($p > 0,6$ o mayor para cualquier comparación pareada, prueba t). En la Figura 22B se demuestra que BAPTA modifica la

liberación de IL-6 a través de NECA, un agonista del receptor de adenosina que potencia la señalización de Ca^{2+} en las células del músculo esquelético (Bernareggi et al., 2015), pero no por el $\text{TNF}\alpha$, que no produce señales de Ca^{2+} en este modelo.

Para un estudio exhaustivo del papel del Ca^{2+} en términos de liberación de IL-6, estudiamos el efecto de un nivel moderado de ionomicina del protonóforo de calcio (0,5 μM), un método clásico para aumentar el Ca^{2+} intracelular. A través de la Figura 22A se muestra que dicho tratamiento indujo un claro aumento en la secreción de IL-6, de acuerdo con un artículo anterior (Keller et al., 2006). En conjunto, estos resultados indican que las señales de Ca^{2+} están implicadas en la estimulación de la secreción de IL-6 y que los iones Ca^{2+} no son sólo un factor requerido o permisivo para la liberación de esta citoquina.

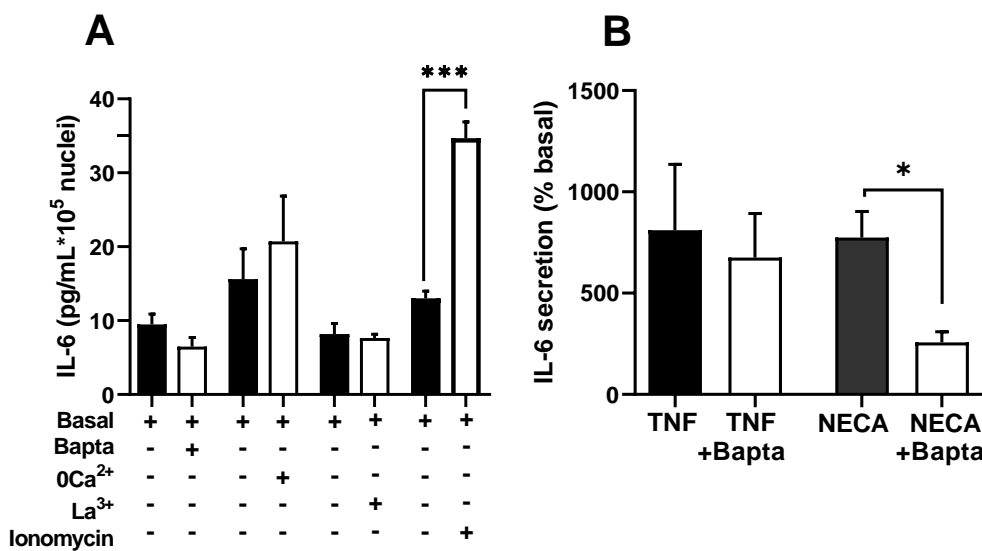


Figura 22. Efectos de BAPTA y la inhibición de la entrada de Ca^{2+} en la secreción de IL-6 en células musculares humanas cultivadas. (A) Secreción de IL6 en reposo y en presencia de Bapta-AM (50 μM), 0 Ca^{2+} y La^{3+} e ionomicina (500 nM). $n=10$ para Bapta, 5 para 0 Ca^{2+} y La^{3+} . Ionomicina indujo un aumento significativo ($***p < 0,005$, prueba t , $n=7$). (B) Secreción de IL6 en presencia de $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/mL), NECA (40 μM), $\text{TNF}\alpha$ -ATP, NECA-ATP. Bapta-AM indujo una reducción significativa en la respuesta a NECA, pero no a $\text{TNF}\alpha$. $*p < 0,05$, prueba t , $n=5$.

Las células del músculo esquelético, como se ha citado anteriormente, median la entrada Ca^{2+} a través de múltiples canales. Para evaluar la implicación de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC) en la secreción de IL-6, se utilizaron una serie de inhibidores selectivos de los principales tipos de canales VOCC presentes en estas células: VOCC de tipo L y T (Cav1.x y Cav3.x). (Luin et al., 2008).

La Figura 23 muestra los efectos de la nifedipina, inhibidor canónico de dihidropiridina para Cav1.x, verapamilo (D600), inhibidor específico de Cav1.x sin relación química, y NNC55-0396, inhibidor específico de los canales tipo T en la señal de Ca^{2+} provocada por ATP. Como se puede observar, la inhibición del canal tipo L inhibe principalmente la fase sostenida de la señal de Ca^{2+} y, en menor medida, el pico de la respuesta inicial. Esto concuerda con la función descrita hasta la fecha de los canales L, no sólo como ruta de entrada de Ca^{2+} al interior celular, sino como activadores de la liberación

de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares a través de los canales receptores de rianodina (RyR).

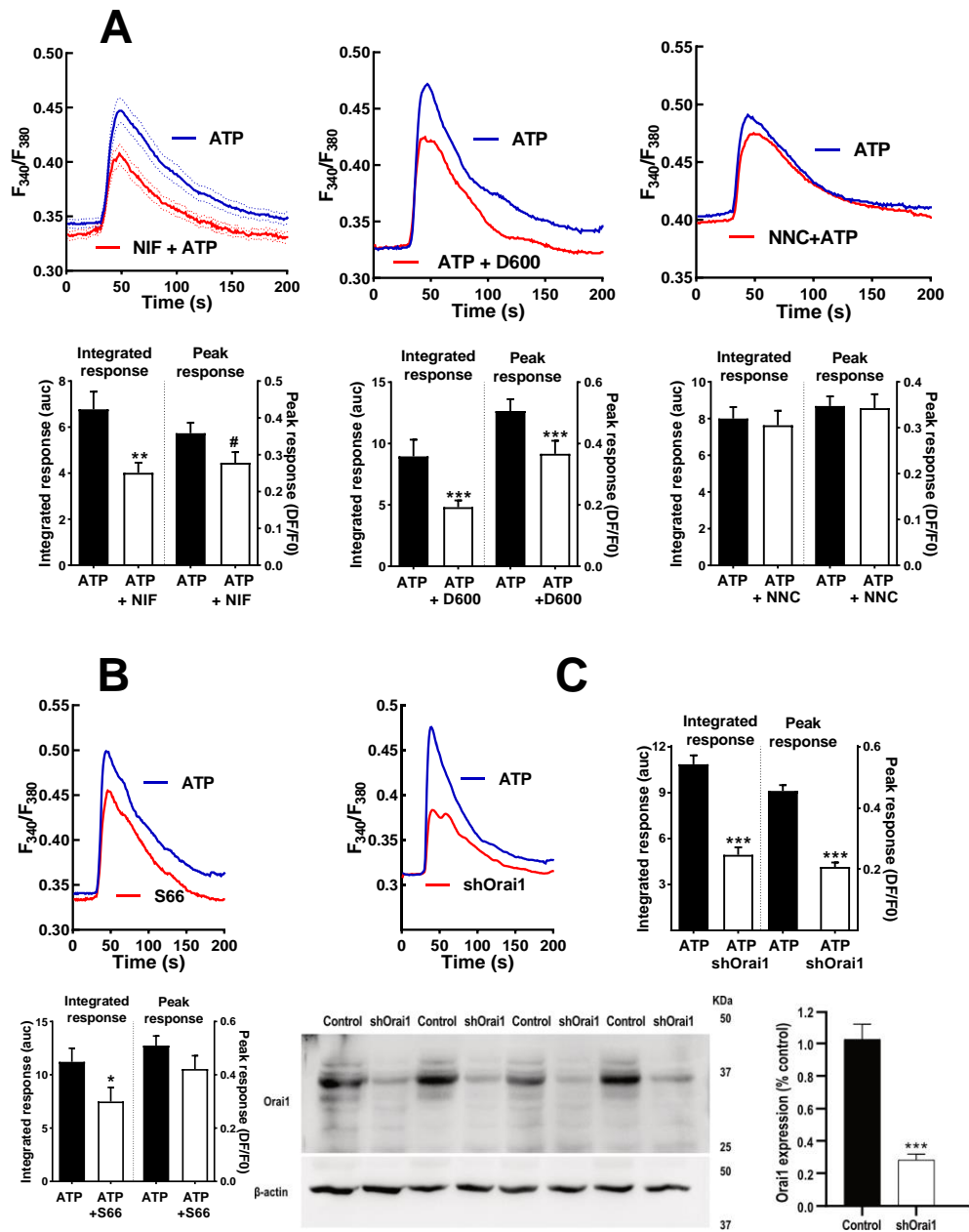


Figura 23. La inhibición de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje y los canales capacitivos de Ca^{2+} modifica las señales de Ca^{2+} en cultivos de músculo esquelético humano. (A) Trazas promedio de la respuesta al ATP en células control (ATP) y células pretratadas durante 15 min con nifedipina (NIF; 10 μ M), verapamilo (D600; 10 μ M) o NNC55-0396 (NNC; 1 μ M). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ # $p < 0,05$ frente a ATP de control, prueba *t*. $n = 91-63$ para ATP-NIF, 39-32 para ATP-D600 y 76-28 células para ATP-NNC. 5-8 experimentos independientes. (B,C) Trazas promedio que muestran el efecto de Synta 66 (S66; 1 μ M) durante 15 min de pretratamiento y de la proteína Orai1 (*shOrai1*) sobre la respuesta de Ca^{2+} al ATP. * $p < 0,05$ *** $p < 0,005$ frente a ATP solo, prueba *t*. $n = 58-38$ células para ATP-S66, 46-65 células para ATP-*shOrai1*. 4 a 8 experimentos. Figura inferior (C) muestra los resultados de la transferencia con el plásmido silenciador *shOrai1*, (incluyendo una comparación de la expresión de Orai1) *** $p < 0,005$, prueba *t*.

La Figura 24 muestra que tanto la nifedipina como el verapamilo indujeron una inhibición estadísticamente significativa de la respuesta secretora de ATP ($p < 0,005$), similar al efecto producido por NNC55-0396, lo que indica que la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje tipo L y T contribuye a la liberación de IL-6. En el caso del canal tipo T, se produjo una supresión casi total de la respuesta, lo que indica que la función de este canal es absolutamente necesaria para la secreción de IL-6.

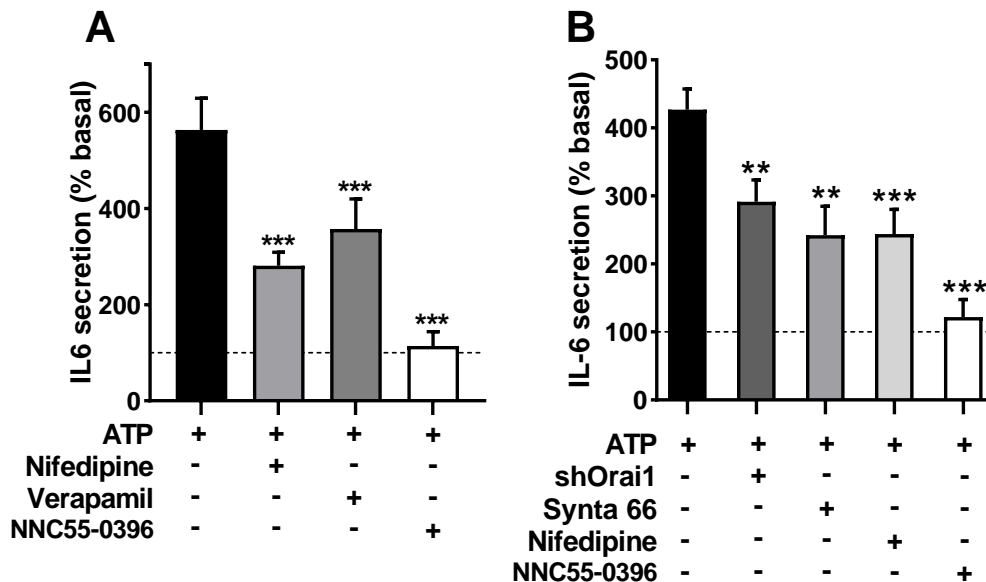


Figura 24. La inhibición de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje y los canales capacitativos altera la secreción de IL-6 en cultivos de músculo esquelético humano. (A) Los cultivos se estimularon con ATP γ S (2h) en ausencia o presencia de los inhibidores nifedipina, verapamilo (D600) o NNC55-0396. El ANOVA unidireccional mostró un efecto significativo para el tratamiento ($F = 12,5$, $p < 0,002$); *** $p < 0,005$ frente a ATP de control, comparación múltiple post-ANOVA. $n = 10$ para control y nifedipina, y 5 para D600 y NNC. (B) Efecto de la transfección *shOrai1*, Synta 66, nifedipina y NNC55-0396 sobre la liberación de IL-6 provocada por ATP. ANOVA unidireccional $F = 11,96$, $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a ATP de control, comparación múltiple post-ANOVA $n = 11$ para el control, 6 para *shOrai* y nifedipina y 5 para Synta66 y NNC55-0396.

La participación de los canales Orai1 Ca^{2+} y su evaluación en este estudio ha sido de gran interés debido a su apertura tras el agotamiento de las reservas internas de Ca^{2+} , esto ha sido posible utilizando el inhibidor selectivo Synta66 (Zhang et al., 2020) y la ablación genética del canal transfectando células con un plásmido silenciador *shOrai1*).

En la Figura 23B se representa la señal de Ca^{2+} en respuesta a ATP, en controles emparejados, células tratadas con Synta66 y células silenciadas con *shOrai1*. La inhibición de la entrada capacitativa de Ca^{2+} por cualquiera de los dos tratamientos afectó directamente a la respuesta sostenida de Ca^{2+} . La respuesta máxima inicial sufrió una ligera reducción (no significativa) en las aquellas células tratadas con Synta66, pero se inhibió claramente en las células transfectadas con *shOrai1* ($p < 0,005$).

Se llevó a cabo una serie adicional de experimentos (los cuales se muestran en la Figura 24B) en los que se determinó la liberación de IL-6 en células tratadas con Synta66, en células transfectadas con *shOrai* y, a modo de comparación, nuevamente en cultivos tratados con nifedipina y el bloqueador de canales tipo T. Por medio de dichos experimentos se descubrió que la inhibición de la entrada capacitativa de calcio fue similar

a la lograda mediante la inhibición del canal tipo tipo L; mientras que la inhibición del canal tipo T condujo a un bloqueo casi total de la respuesta. Este resultado demuestra que existe una implicación directa de los canales capacitivos y del canal de Ca^{2+} de tipo L en la liberación de IL-6 por el ATP, además de confirmar la existencia de una dependencia directa de los canales T.

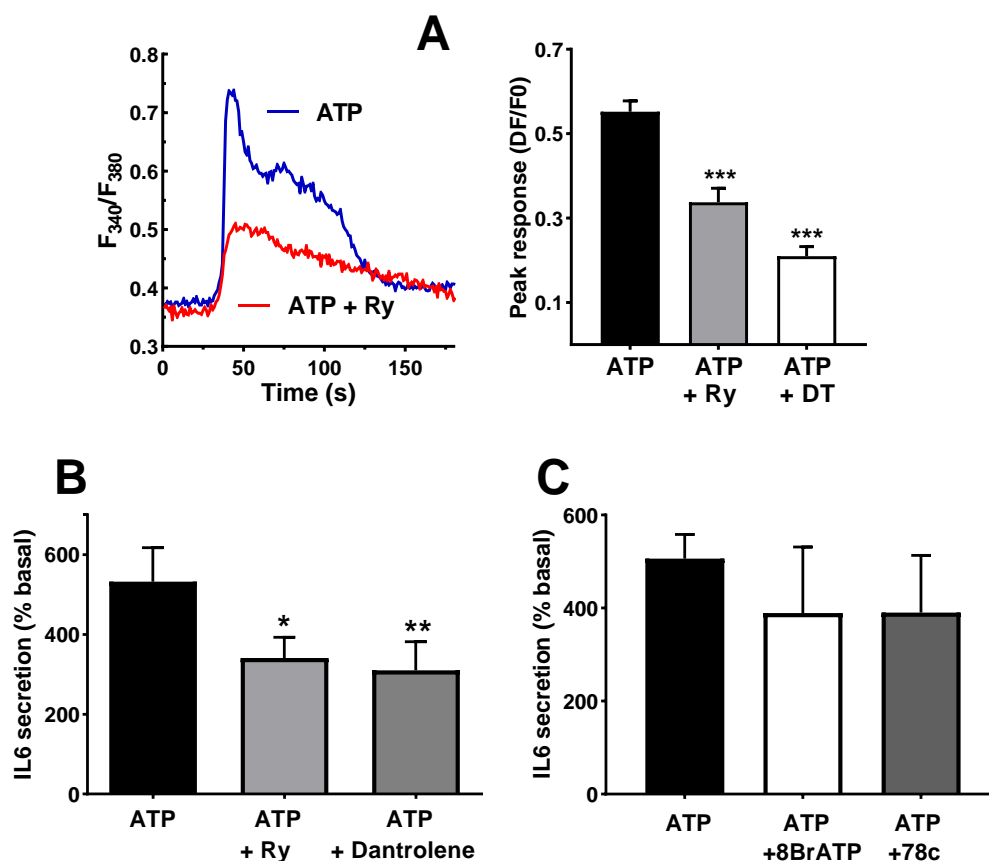


Figura 25. El receptor de rianodina participa en la secreción de IL-6. (A) Efecto del pretratamiento con rianodina en el pico de Ca^{2+} en respuesta al ATP. Figura derecha representa la inhibición por rianodina (Ry; $10\mu\text{M}$) y dantrolene ($10\mu\text{M}$). ANOVA unidireccional $F = 28,73$, $p < 0,0001$; *** $p < 0,005$ frente a no tratados, prueba post-ANOVA. $n = 29-95$ células. (B) Efecto de rianodina y dantrolene en la IL-6 liberada en respuesta a ATPyS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Control, prueba post-ANOVA ($F = 12,23$, $p < 0,046$ para el efecto del tratamiento), $n = 5$. (C) Efectos de 8BrADPr y el inhibidor de CD38 (78c) en respuesta a ATPyS. El análisis ANOVA no mostró efecto para el tratamiento ($p < 0,68$), $n = 4$.

Existe la posibilidad de que la secreción de IL-6 inducida por ATP tenga un componente dependiente de la liberación de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares. Para el estudio de este componente se utilizaron inhibidores de los receptores RyR e IP_3R . Para inhibir RyR, se utilizaron concentraciones supramicromolares de rianodina y dantrolene, conocidos por ser inhibidores directos del receptor RyR (Eltit et al., 2006). En la Figura 25 se muestra que ambos compuestos alteraron la parte inicial de la señal de Ca^{2+} , como se esperaba, para una liberación de Ca^{2+} de forma reducida desde las reservas intracelulares. Estos compuestos también inhibieron la respuesta de IL-6 al ATP, como se esperaba si la liberación de Ca^{2+} a través de RyR estuviera involucrada en la secreción. Para evaluar si cADPr, el agonista endógeno del RyR, participa en la secreción de IL-6, los cultivos se trataron con un antagonista de esta molécula, 8Br-cADPr, y con un inhibidor de la ADP-ribosil ciclasa, 78c, siendo la enzima responsable de su síntesis. Ambos tratamientos

indujeron una reducción leve y estadísticamente no significativa de la secreción (Figura 25C); esto sugiere que cADPr no participa en la secreción de IL-6 a través de ATP. Por tanto, estos resultados muestran que RyR no necesita la contribución de cADPr para promover la secreción de IL-6, lo que indica que existe una activación directa por canales de tipo L.

Se ha demostrado que además de los receptores RyR, los depósitos operados por receptores IP₃R son la otra ruta principal para liberar Ca²⁺ directamente desde los depósitos internos en respuesta a agonistas en las células del músculo esquelético (Buvinic et al., 2009; Eltit et al., 2006). Debido a este hecho, los cultivos se trataron con los compuestos 2-APB y xestospongina C, dos inhibidores del IP₃R. Esto indujo una clara reducción en la fase donde se produce el pico de la señal de Ca²⁺, como se puede observar en los apartados A y B de la Figura 26. También se obtuvo como resultado una disminución significativa de la IL-6 secretada en respuesta a la estimulación del ATP (Figura 26C). El efecto inhibitorio de 2APB fue más fuerte que el efecto de xestospongina C sobre la liberación de IL-6, probablemente debido a su mayor inhibición de la señal de Ca²⁺.

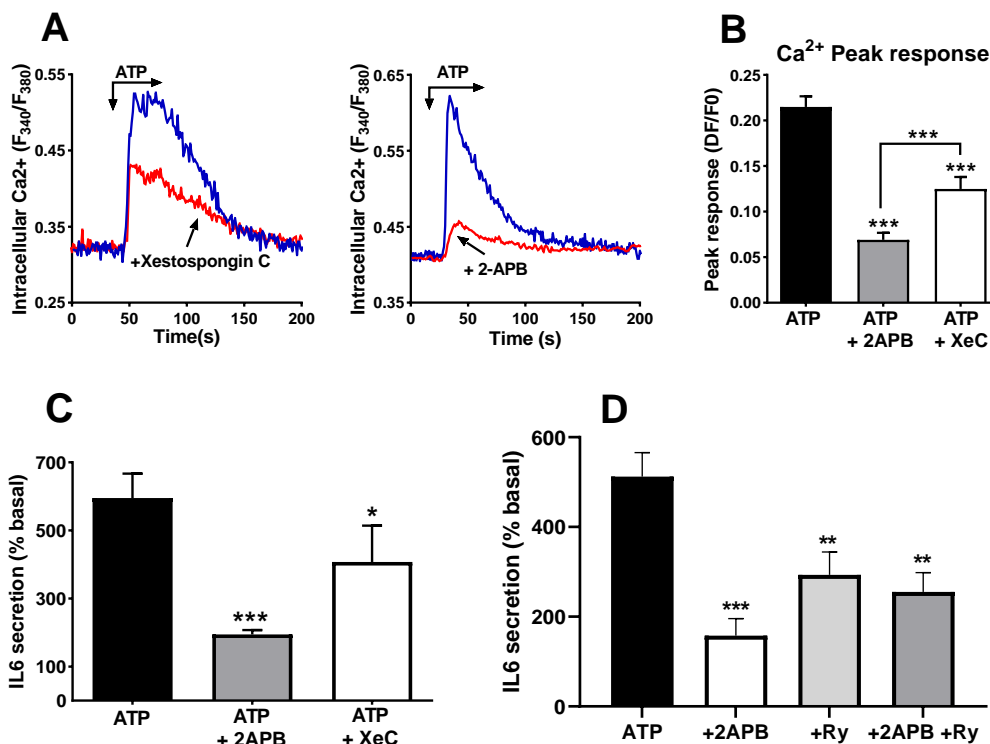


Figura 26. Los inhibidores de los receptores IP₃ alteran la secreción de IL-6 inducida por ATP. (A) Registro representativo de señales de Ca²⁺ inducidas por ATP en células de control y en células pretratadas (15 min) con Xestospongina C (XeC; 4 μM) o 2-APB (50 μM). (B) Representa la comparación de las respuestas máximas. ANOVA F = 41,25 p < 0,0001. ***p < 0,005 frente a ATP de control, comparaciones post-ANOVA o entre los grupos 2APB y XC (prueba t). n = 60 células para 2APB, 70 para XeC y 110 para ATP solo. Ocho experimentos para control, cinco para 2APB y XeC. (C) Cultivos de músculo esquelético humano estimulados con ATPγS en ausencia o presencia de 2-APB o Xestospongina C. *p < 0,05, ***p < 0,005 frente a control, múltiples comparaciones post-ANOVA (ANOVA unidireccional F = 11,6, p < 0,004 para el efecto del tratamiento). n = 6 para 2-APB y 5 para la secreción de xestospongina (C,D) IL-6 en respuesta a ATP solo o en presencia de 2-APB, rianodina o una combinación de ambos. ANOVA F = 10,25, p < 0,001, **p < 0,01, ***p < 0,005 frente a ATP solo, n = 4.

Se conoce que ambos tipos de depósitos intracelulares de Ca²⁺ son activados por el ATP y contribuyen a la liberación de IL-6 de forma independiente, por lo que su

inhibición de manera simultánea debería dar como resultado una reducción adicional en la liberación de IL-6. En base a esto, se realizaron repeticiones de los experimentos usando 2-APB, rianodina y una combinación de ambos inhibidores. La presencia simultánea de rianodina y 2-APB no anuló la liberación de IL-6 y no se dieron diferencias estadísticamente significativas entre los inhibidores y su combinación (Figura 26D).

Para corroborar aún más la participación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} en la secreción de IL-6, se realizaron experimentos adicionando cafeína. Se sabe que este fármaco libera Ca^{2+} desde los depósitos que contienen RyR (Weigl et al., 2003) e inhibe el IP_3R (Huang et al., 2017), además de haber sido demostrada su capacidad de libera IL-6 de las células del músculo esquelético en cultivo (Fang et al., 2019). Por lo tanto, cabe esperar que la cafeína libere IL-6 en cultivos no estimulados y disminuya la respuesta al ATP, debido a que se basa parcialmente en IP_3R . Se comprobó que la aplicación de cafeína 15 minutos antes de la estimulación con ATP mejoró la secreción de IL-6 en condiciones de reposo; por el contrario, redujo la secreción en respuesta a ATP, como se esperaba, por un compuesto que interfiere con la vía IP_3R (Figura 27).

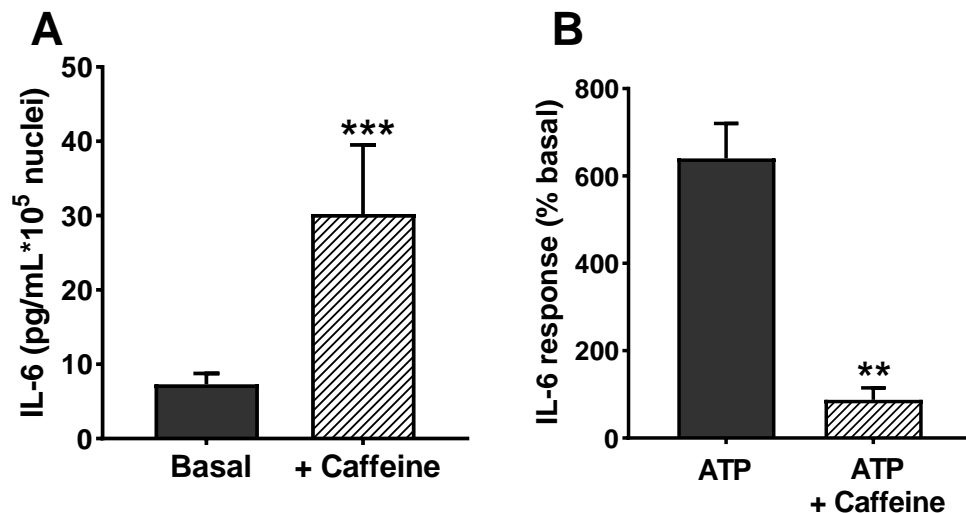


Figura 27. Efectos de la cafeína sobre la liberación de IL-6 en células de músculo esquelético humano cultivadas. (A) Secreción de IL-6 en cultivos en reposo en ausencia y presencia de cafeína (1 mM). (B) Efecto de la cafeína en respuesta a ATPγS (porcentaje respecto a la secreción basal). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ frente a control; $n = 4$.

Siendo demostrado que la respuesta secretora involucra elementos de señalización de Ca^{2+} , se evaluó la participación de la proteína fijadora de Ca^{2+} , calmodulina, utilizando su inhibidor calmidazolium. La Figura 28A muestra que la adición de calmidazolium durante la estimulación produjo una disminución estadísticamente significativa en la liberación de IL-6 inducida por ATP en comparación con cultivos no tratados con este inhibidor ($p < 0,05$). Dado que la inhibición de la calmodulina altera la respuesta de la IL-6 al ATP, se comprobó si la inhibición de la calcineurina y la quinasa II activada por calmodulina (CaMKII) también alteraban la respuesta. El tratamiento con el inhibidor de la calcineurina FK506 dio como resultado una reducción de la liberación de IL-6 provocada por ATP en comparación con las células de control (Figura 28B; $p < 0,05$). Para descartar la posibilidad de que el efecto de FK506 no estuviese mediado por la inhibición de la calcineurina sino por la unión a proteínas FKBP, siendo reguladores conocidos de RyR, se utilizó rapamicina, un fármaco

que se une a FKBP sin efecto sobre la calcineurina, y se descubrió que no existe efecto alguno sobre la secreción de IL-6. En el caso de CaMKII, el uso de una concentración máxima de su inhibidor específico KN93 sólo indujo una ligera reducción en el límite de significancia en comparación con cultivos no tratados o con el análogo inactivo de KN93, KN92 (Figura 28C). Esto indica que la principal vía de señalización de la secreción de IL-6 mediada por calmodulina no es CaMKII sino calcineurina.

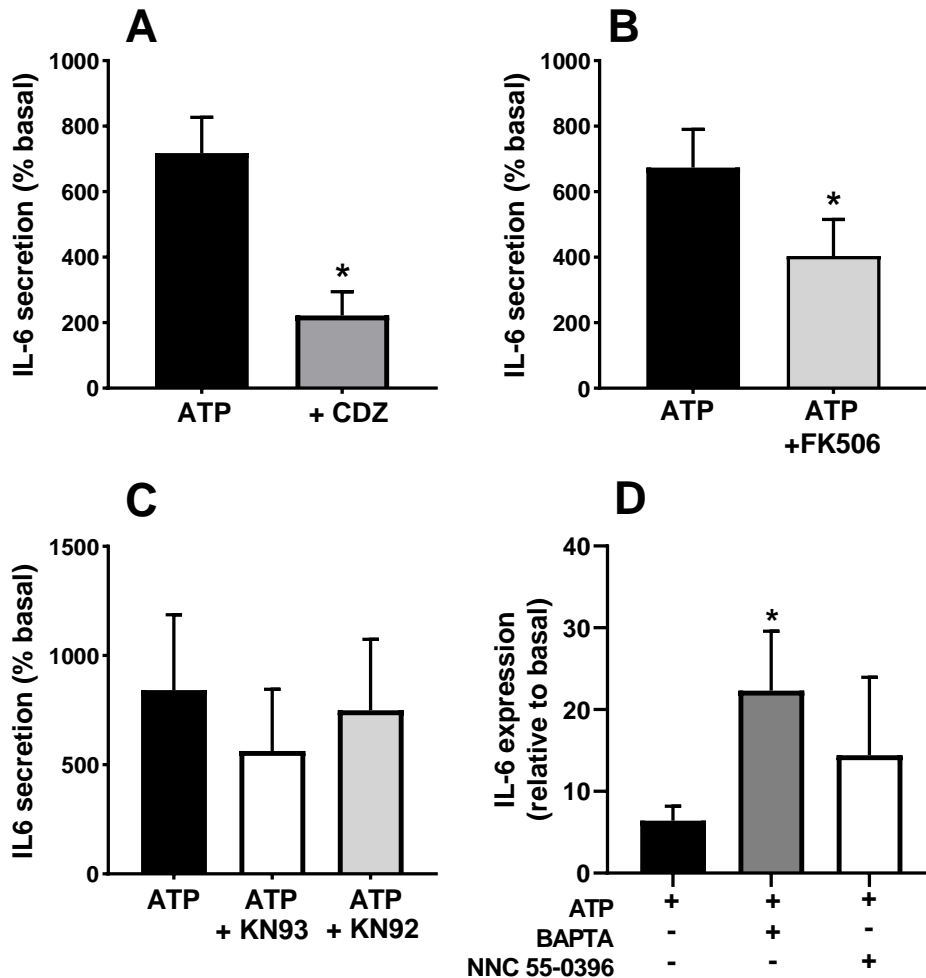


Figura 28. Efectos de la calmodulina, la calcineurina y los inhibidores de la traducción en la secreción de IL-6 inducida por ATP. Cultivos de músculo esquelético humano estimulados con ATP γ S en ausencia o presencia de inhibidores de (A) calmidazolio (CDZ, inhibidor calmodulina; 10 μ M), (B) FK506 (inhibidor calcineurina; 10 μ M) y (C) KN93 y sus análogo inactivo KN92 (inhibidor CaMKII; 3 μ M). * $p < 0,05$ frente a prueba *t* pareada de ATP $n = 6$ (A), $n = 4$ (B), $n = 3$ (C). ANOVA no mostró diferencias para KN93 ($F = 2,72$, $p > 0,2$). (D) Transcripción de IL-6 (normalizada a GAPDH) en respuesta a ATP en ausencia o presencia de Bapta-AM o NNC 55-0396 * $p < 0,05$, prueba *t*, $n = 5$.

Encontramos en la bibliografía, demostrado por diversos autores, que el ATP estimula la transcripción de IL-6 en el músculo de roedores (Bustamante et al., 2014). Existe la posibilidad de que las señales de Ca²⁺ en respuesta al ATP operen a nivel transcripcional o postranscripcional. Para poder determinar esta cuestión, se evaluaron los cambios en los niveles de ARNm de IL-6 en respuesta al ATP. La Figura 29D muestra que el ATP indujo un aumento el cual fue inhibido por el quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA. Se pudo comprobar que la transcripción de IL-6 mejoró en cultivos cargados con BAPTA.

Este resultado indica que el papel de las señales de Ca^{2+} en la secreción de IL-6 tiene lugar a nivel postranscripcional. También se valoró el efecto del bloqueador del canal T NNC 35-0396 sobre la expresión de IL-6. De manera similar a la carga de BAPTA, este tratamiento no tuvo efecto, como era de esperar ya que los canales de calcio de tipo T operan solo en el proceso de excitación.

DISCUSIÓN

Existe una extensa literatura sobre la liberación de IL-6 y otras mioquinas en el músculo esquelético, pero es de destacar la escasez de conocimiento sobre los mecanismos celulares que promueven esta secreción endocrina, especialmente considerando el papel fisiopatológico de la IL-6. Los estudios existentes sobre el papel de las señales de Ca^{2+} la mayoría se han realizado en modelos de roedores, existiendo contados estudios en el músculo esquelético humano, incluida la liberación de IL-6 en respuesta al ionóforo de Ca^{2+} (Keller et al., 2006), la activación de RyR (Ducreux et al., 2004) y la despolarización (Treves et al., 2011).

Este trabajo revela que la entrada de Ca^{2+} a través de VOCC y *Orai1*, así como la liberación de Ca^{2+} de los depósitos a través RyR/IP₃R, median la liberación de IL-6 en respuesta al ATP, un agonista celular clave en el músculo esquelético en desarrollo (Matta et al., 2016). Los canales de Ca^{2+} de tipo L o Cav1.x se consideran como el sensor de voltaje en el mecanismo molecular que acopla la excitación del sarcolema a la contracción (Tanabe et al., 1988) y a la entrada de Ca^{2+} (Bannister et al., 2008). Cav1.x induce la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos internos al interactuar con RyR del retículo sarcoplásmico (Ávila et al., 2019). Este acoplamiento se da de forma bidireccional debido a que RyR puede sensibilizar los canales L por cambios de voltaje (Huang et al., 2011). Se ha demostrado a través de diversos artículos en cultivos de músculos de roedores adultos que este canal forma un complejo multimolecular con otras moléculas de señalización como panexina, caveolina y receptores purinérgicos (Jaque-Fernández et al., 2021; Arias-Calderón et al., 2016).

De acuerdo con los precedentes anteriores, los datos actuales indican que tanto los canales L como los receptores RyR desempeñan un papel en la liberación estimulada de IL-6. Aunque el estudio no fue diseñado para investigar la regulación de los mecanismos, de alguna manera sorprende que el tratamiento con antagonistas de la ruta cADPr no tenga efecto sobre la secreción de IL-6 ya que este mensajero activa la liberación de Ca^{2+} de RyR. Para poder explicar el reclutamiento de RyR en la secreción de IL-6 nos centramos en la interacción molecular directa que ensambla los canales L y RyR durante la estimulación con ATP, dada la evidencia descrita anteriormente.

La importancia de los canales VOCC para la secreción de IL-6 implica que pueda estar también involucrada en la despolarización. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la secreción de IL-6 en cultivos de músculo esquelético depende de la entrada de iones Ca^{2+} externos, como lo demuestran los efectos del medio bajo en Ca^{2+} , el bloqueador no específico La^{3+} y los inhibidores de Canales VOCC y *Orai1*. Aunque existen evidencias de que la entrada de iones Ca^{2+} durante el acoplamiento excitación-contracción en el músculo adulto del ratón es vestigial (Dayal et al., 2017), hay pruebas que avalan la existencia de una entrada de Ca^{2+} durante la activación (Treves et al., 2011). En conjunto,

los datos mostrados indican que la estimulación de la secreción de IL-6 a partir de células musculares cultivadas requiere señales Ca^{2+} impulsadas por la entrada de Ca^{2+} extracelular y por la liberación Ca^{2+} de los depósitos a través de RyR e IP₃R. En las células musculares, el ATP moviliza las reservas de calcio intracelular (May et al., 2006) estableciéndose la presencia de canales de Ca^{2+} operados por almacenamiento (SOCC) (Darbellay et al., 2011).

Se plantea la posibilidad de que, una vez activado el influjo de Ca^{2+} por la movilización de las reservas de Ca^{2+} operadas por IP₃R a través de los canales de *Orai* se pueda despolarizar las membranas plasmáticas y desencadenar VOCC tanto directa como indirectamente mediante la activación de los canales catiónicos TRPC, lo que a su vez mejoraría la despolarización (Cheng et al., 2011; Sánchez-Collado et al., 2022). Esta secuencia explicaría la fuerte inhibición sobre la liberación de IL-6 inducida por el inhibidor de IP₃R, 2APB. Además, esto es compatible con la falta de un efecto adicional de los inhibidores de IP₃R y RyR observada en nuestros experimentos (Figura 29).

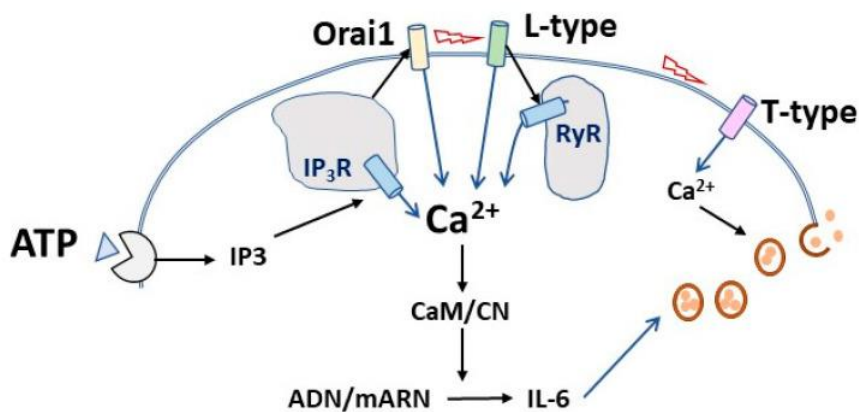


Figura 29. Hipótesis de los eventos secuenciales en la liberación de IL-6 mediada por calcio inducida por ATP en células musculares cultivadas. Tras la unión del ATP a los receptores purinérgicos, la síntesis de IP₃ conduce a la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares, activando así la entrada de Ca^{2+} a través de los canales capacitativos Orai1. Esto podría provocar la despolarización de la membrana y la activación de los canales de calcio tipo L, lo que resultaría en un mayor aumento de Ca^{2+} a través del influjo directo y la activación directa de los receptores de rianodina asociados (RyR) de las reservas intracelulares. La señal de Ca^{2+} activa la traducción de IL-6 que se liberaría mediante la operación de canales de calcio de tipo T activados por voltaje.

Un hallazgo a destacar es el hecho de que el inhibidor específico de los canales de Ca^{2+} tipo T logró una fuerte inhibición sin mostrar ninguna contribución a la señal de Ca^{2+} de la célula inducida por ATP (Figura 23 y Figura 24). Este resultado se puede explicar tomando al canal de tipo T como un componente necesario para la secreción final de IL-6 pero sin estar implicado en la formación de la señal de Ca^{2+} celular (Figura 29). Se sabe que los canales de Ca^{2+} de tipo T contribuyen a la liberación de neurotransmisores en las neuronas y las células cromafines (Carbone et al., 2014). Existen evidencias indirectas que vincula la IL-6 y los canales tipo T. Los inhibidores de estos canales mejoran los efectos de los procesos inflamatorios relacionados con la IL-6 (Wan et al., 2020; El-Haggar et al., 2022), y la IL-6 posee la capacidad de regular tanto la expresión como la funcionalidad de los canales de tipo T (Jeevakumar et al., 2020; Weaver et al., 2015; Liu et al., 2019).

La mayoría de los estudios existentes sobre la transducción de señales para la secreción de IL-6 se han realizado en modelos de roedores e involucran una serie de vías de señalización intracelular como mediadores de la liberación de IL-6, como STAT3 (Bustamante et al., 2014), JNK/MAPK (Frost et al., 2004; Whitham et al., 2012) y AMPK (Weigert et al., 2007; Klymenko et al., 2020). Estas vías conducirían a la activación de los factores de transcripción NFκB, AP-1 (Juretic et al., 2006) y Srf (Guerci et al., 2012) que promueven la secreción de IL-6, mientras que el regulador epigenético HDAC5 (Klymenko et al., 2020) parece inhibirla. Los datos aportados están en consonancia con un artículo anterior (Buvinic et al., 2009) que muestra que la calmodulina y su efector, la calcineurina, median la secreción de IL-6, mientras que el efector de calmodulina, CaMKII, posee un papel residual en esta respuesta.

Los datos mostrados indican que las señales de Ca^{2+} funcionan en el nivel postranscripcional, en contraste con un artículo previo en el músculo de roedores (Bustamante et al., 2014). La razón de esta discrepancia podría ser una diferencia en el objetivo de las señales de Ca^{2+} en el sistema de circuito de retroalimentación positiva mostrados por sus autores. Dichos autores propusieron que la señal de Ca^{2+} como respuesta al ATP activa una transcripción temprana de IL-6, lo que conduce a una mayor secreción de esta citocina a través de la vía autocrina. En el sistema experimental que se llevó a cabo, la IL-6 inicial podría deberse más bien a la activación de pasos de traducción/exocitosis. Esto está en consonancia con la fuerte inhibición producida por el inhibidor específico del canal T y el claro efecto inhibitor del bloqueante de la traducción, cicloheximida, en la secreción de IL-6 (Bustamante et al., 2014) (siendo todo esto corroborado por resultados aún no publicados del laboratorio)

Evidencias previas sobre la participación de señales de Ca^{2+} en la secreción de IL-6 son fragmentarios y, en el caso de células humanas, casi inexistentes. La evidencia presentada en este estudio describe por primera vez de manera integral la participación de los principales elementos de la vía de señalización de Ca^{2+} en la secreción estimulada de IL-6 de las células del músculo esquelético. Además de su participación en la contracción, transcripción y diferenciación, esta vía de señales es probablemente un regulador fisiológico de la secreción de IL-6. Dada la importancia de esta citocina en un amplio grupo de procesos metabólicos, inmunológicos y fisiopatológicos, es necesario un estudio exhaustivo y una total comprensión de esta.

RESULTADOS. CAPITULO III

RESULTADOS

Si la IL-6 retroalimenta su propia secreción, es de esperar que la producción final de IL-6 (es decir, la cantidad total de IL-6 liberada al medio extracelular) sea mayor en presencia de una mayor concentración de IL-6. Por lo tanto, se realizaron diversos experimentos en cultivos de músculo esquelético humano utilizando dos volúmenes diferentes de sobrenadante, 0,5 y 1 ml, de modo que la concentración de IL-6 fuera diferente, tanto en condiciones de reposo como de estimulación (Figura 30 parte superior). La producción calculada de IL-6 en condiciones de reposo no fue significativamente diferente entre los experimentos de sobrenadante de 0,5 y 1 ml ($p > 0,09$, prueba t pareada), aunque fue ligeramente menor para los experimentos de sobrenadante de 1 ml ($12.20 \pm 2.55 \text{ ng} \cdot 10^{-5} \text{ células}$ frente a 17.29 ± 5.0 para 0,5 mL, $n=8$). Sin embargo, la comparación de la secreción estimulada por ATP reveló una disminución leve y estadísticamente significativa en la respuesta de ATP para experimentos de 1 ml ($48.8 \pm 10.41 \text{ ng} \cdot 10^{-5} \text{ núcleos}$) en comparación con las condiciones de 0,5 ml ($76,48 \pm 15,54$; $p < 0,032$, $n=8$). La respuesta estimulada por ATP normalizada con respecto a la basal también fue ligeramente menor para 1 ml ($535 \pm 202 \%$ frente a 617 ± 146 para 0,5 ml), aunque estadísticamente no fue diferente ($p < 0,23$, prueba t). A través de otra serie de experimentos se compararon la producción de IL-6 en 0,35 y 1 ml de sobrenadante, para concentrar aún más la IL-6 liberada tanto en condiciones basales como estimuladas. Como se muestra en la Figura 30 (parte inferior), los resultados fueron similares a los encontrados con 0,5 frente a 1 ml. La secreción en reposo de IL-6 fue menor en 1 ml que en 0,35 ml (7.98 ± 2.20 vs $14.17 \pm 4.54 \text{ ng} \cdot 10^{-5} \text{ células}$; $p < 0,03$, $n=5$). Se observó el mismo efecto para la secreción estimulada por ATP (49.73 ± 8.2 vs $68.97 \pm 10.75 \text{ ng} \cdot 10^{-5} \text{ células}$, 1 ml y 0,35 respectivamente; $p < 0,013$, $n=5$).

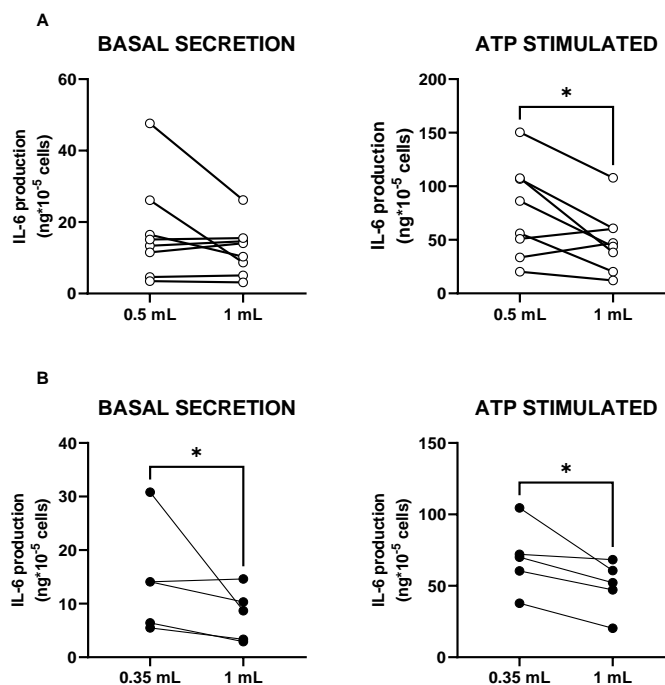


Figura 30. Secreción de IL-6 en condiciones de reposo y estimuladas (ATP 500 μM) a diferente volumen de sobrenadante, libre de suero, durante 2 horas. Los resultados de 7 (Figuras superiores) y 5 (Figuras inferiores) experimentos se realizaron en paralelo en condiciones estimuladas y no estimuladas (basal). * $p < 0,05$, prueba t pareada.

Los resultados anteriores indican que las moléculas de IL-6 extracelulares ejercen un efecto de retroalimentación positiva sobre la secreción de IL-6. Si esto es cierto, tamponamiento de las moléculas extracelulares de IL-6 debe reducir la secreción. Para estudiar este punto, se determinó la secreción de IL-6 en presencia de una alta concentración de la proteína alfa del receptor soluble (IL-6R α). La Figura 31 muestra como este tratamiento inhibió la respuesta inducida por ATP, de acuerdo con los resultados anteriores.

El efecto de retroalimentación autocrina podría deberse a los receptores de IL-6 ubicados en la membrana plasmática de las células diana. De ser así, el bloqueo de estos receptores reduciría la liberación de IL-6. Por lo tanto, se realizaron experimentos con tocilizumab y anticuerpos dirigidos al receptor de IL-6. La Figura 31 muestra como este tratamiento inhibió significativamente la respuesta al ATP, lo que confirma que la unión a IL6R es un requisito crucial para el circuito de retroalimentación. Ni IL6Ra ni tocilizumab modificaron la secreción en reposo (no se muestra). En conjunto, los resultados de la Figura 31 indican que la IL6 liberada por las células musculares durante la estimulación con ATP retroalimenta la liberación de IL-6, ya sea a nivel transcripcional o postranscripcional.

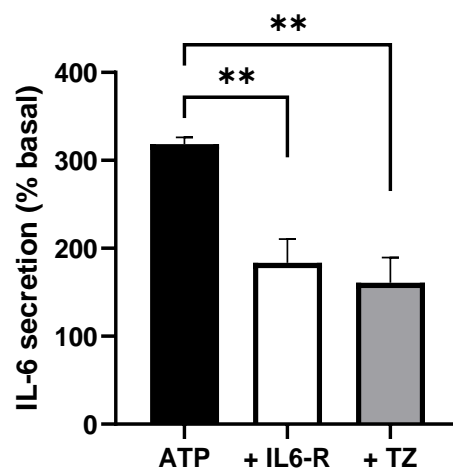


Figura 31. Efecto de los receptores de IL-6 solubles (IL-6R) y tocilizumab (TZ) sobre la secreción de IL-6 inducida por ATP. Se trataron células de músculo esquelético humano durante 2 horas con ATP solo o 15 minutos después de la adición del receptor alfa de IL-6 soluble (IL-6R, 1ng/ml) o tocilizumab (20 μ g/ml). n=5. ** p<0,01 post prueba ANOVA de Dunnett (ANOVA de Welch p< 0,001).

Existen otros tipos celulares en los que el efecto de señalización de retroalimentación de la IL-6 se produce a través de la vía endocítica. Se ha propuesto que el compartimento endosómico de la célula puede ejercer una función de plataforma de señalización (Piessevaux et al., 2009). Para verificar esta posibilidad, se realizó un experimento en presencia de dynasore, un conocido inhibidor de la dinamina, una proteína clave en el proceso de endocitosis. Como se muestra en la Figura 32, este compuesto suprimió prácticamente la respuesta secretora al ATP, lo que demuestra que la endocitosis es un requisito para mantener la liberación de IL-6.

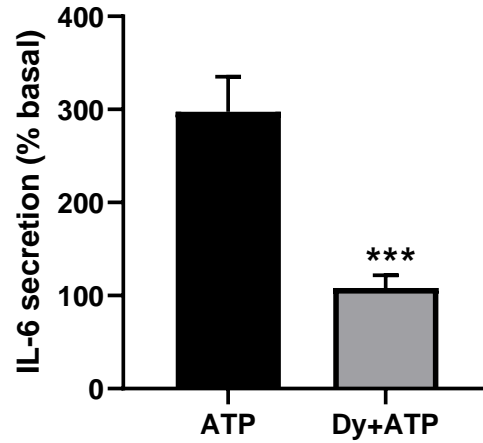


Figura 32. Efecto del inhibidor de la endocitosis dynasore en la secreción de IL-6. Resultados obtenidos tras la estimulación con ATP y dynasore-ATP (80 μ M) n=9. P<0,005, prueba t pareada.

Dado que las vesículas endocíticas se transfieren al compartimento endocítico de las células, se realizaron una serie de experimentos con tratamientos destinados a inhibir la acidificación de estas vesículas, siendo necesario para el procesamiento de dichas vesículas. La Figura 33 muestra que tanto la cloroquina como, en menor medida, la monensina, alteraron significativamente la liberación de IL-6. Se encontró un resultado similar para la base permeable a las células NH_4Cl . Por lo tanto, se podría afirmar que la secreción de IL-6 requiere no sólo endocitosis sino también un compartimento endocítico ácido funcional.

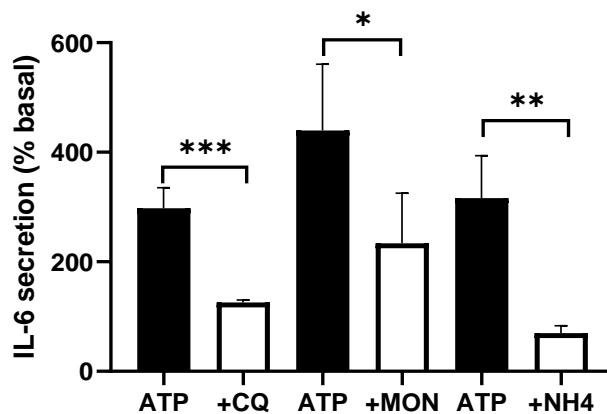


Figura 33 Los inhibidores del compartimento endocítico reducen la secreción de IL-6 en respuesta al ATP en cultivos de células del músculo esquelético. Las células se estimularon con ATP solo o 15 minutos después de la adición de cloroquina (200 μ M), monensina (2 μ M) o NH_4Cl (50 mM) para bloquear la acidificación del compartimento endosomal de la célula. n=9 para cloroquina y 4 para monensina y NH_4Cl . * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,005 respecto al ATP solo, prueba t pareada.

DISCUSIÓN

El presente estudio proporciona evidencias directas que muestra que en células musculares cultivadas humanas la IL-6 liberada en respuesta al ATP ejerce una retroalimentación positiva en la secreción de IL-6. Este mecanismo está mediado por receptores de IL-6 y opera desde el compartimento endocítico.

La IL-6 es liberada desde las células del músculo esquelético durante la contracción (Peake et al., 2015). Estudios previos realizados en roedores han revelado la importancia del ATP en este proceso, dado que este mensajero es responsable de la secreción de IL-6 en células musculares como respuesta a la estimulación eléctrica (Bustamante et al., 2014; Juretic et al., 2006; Buvinic et al., 2009). Artículos previos han demostrado que la IL-6 opera a través de un circuito de retroalimentación positiva de forma autocrina a nivel de la transcripción de ARN en roedores (Bustamante et al., 2014). Existen evidencias del proceso de retroalimentación de IL-6 en otros sistemas, como las células inmunitarias (Verboogen et al., 2019) y los hepatocitos (German et al., 2011; Shah et al., 2006). Sin embargo, la mayoría de las evidencias se basan en determinaciones de la transcripción y de la vía STAT3 estimulada por la IL-6, y no en la evaluación directa de la secreción de IL-6. En este estudio se muestran evidencias de que la secreción de IL-6 en respuesta al ATP en cultivos de músculo esquelético humano está respaldada por un mecanismo de retroalimentación positiva. Se ha demostrado que existe una disminución de la IL-6 extracelular mediante el aumento del sobrenadante del cultivo o la adición del receptor soluble IL-6Ra disminuye la respuesta secretora al ATP. En algunos sistemas, como los osteoblastos (Franchimont et al., 1997), parece que la activación trans, es decir, la activación de la proteína del receptor gp130 por el IL6-R alfa soluble unido a la IL-6, es responsable de la potenciación de la respuesta de la IL-6. Sin embargo, este evento no se da en las células musculares, dado que a través de este estudio se ha demostrado que la adición de IL-6R alfa soluble posee un efecto inhibitorio. En segundo lugar, la presencia de tocilizumab, un anticuerpo específico dirigido al receptor humano de IL-6, también inhibió la respuesta. Junto con el hallazgo anterior, este resultado muestra claramente que parte de la IL-6 liberada por el ATP se debe a un efecto autocrino de la IL-6 que actúa sobre sus receptores. Este hallazgo concuerda no sólo con resultados previos de transcripción y activación de STAT3, sino también con evidencias que corroboran como la IL-6 recombinante induce la liberación de IL-6 del músculo al plasma (Keller et al., 2003).

Se ha informado que el compartimento endosómico sirve como plataforma para varios sistemas de señalización, incluida la vía de la IL-6 (Piessevaux et al., 2009; Platta and Stenmark, 2011). Tras la unión de IL-6 a IL-6R alfa (unión a la proteína ubicua receptora gp130), los complejos IL-6/IL-6R sufren un proceso de endocitosis y se dirigen al compartimento endocítico ácido. Aquí mostramos que las células musculares también utilizan la vía endocítica para desencadenar la respuesta autocrina positiva: el inhibidor de dinamina y tres compuestos diferentes destinados a tamponar las vesículas ácidas de la vía endocítica redujeron la respuesta al ATP. El inhibidor de dinamina, dynasore, ejerció una fuerte inhibición la cual indujo un bloqueo casi total de la respuesta secretora. Esto indica que la retroalimentación no tiene solo una función de mejora o como prolongación de la liberación de IL-6, sino que es un paso necesario e importante en la secreción.

Se ha propuesto que el compartimento endosómico no sólo sirve para la IL-6 secretada que actúa de forma autocrina, sino también para las moléculas de IL-6 recién

formadas que se dirigen desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática a través de los endosomas de reciclaje (Verboogen et al., 2019; German et al., 2011). Estas moléculas se unirían al IL-6R presente en este compartimento operando como señales inhibitoras para limitar la secreción de IL-6 mediante la fosforilación de STAT3 en el residuo Tyr705 (Verboogen et al., 2019). A medida que las moléculas de IL-6 se reciclan el efecto inhibitor se atenuó mediante la activación de MAP38K por IL-6 (otra vía promovida por IL-6) a partir de endosomas reciclados. No existen estudios que avalen si tal efecto inhibitor está presente en las células musculares.

Anteriormente este grupo ha demostrado que los canales de tipo T activados por Ca^{2+} son obligatorios en la secreción de IL-6 en respuesta al ATP (ver capítulo anterior). Se sabe que los canales de Ca^{2+} tipo T son responsables del desencadenamiento de la exocitosis en varios sistemas (Carbone et al., 2014). Además, en macrófagos la secreción de IL-6 está mediada por proteínas SNARE relacionadas con la exocitosis (Manderson et al 2007). Por lo tanto, este estudio y las evidencias existentes apoyan la hipótesis de que la vía vesicular exocítica/endocítica juega un papel fundamental en la secreción de IL-6 inducida por ATP. Un conjunto preformado de IL-6 sería liberado por señales de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} de tipo T, incorporándose las moléculas de IL-6 liberadas a la ruta del endosoma tras su unión a los receptores alfa de IL-6R. Este compartimento serviría entonces como plataforma o andamio para prolongar la transcripción activadora de la secreción de IL-6. La activación de este mecanismo necesitaría una cantidad limitada de moléculas de IL-6 preformadas (Verboogen et al., 2018) y receptores de IL-6 (Hansen et al., 2020), como se ha demostrado para las células inmunitarias.

RESULTADOS. CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Dado que la edad altera en otros tipos celulares algunos elementos de la señal de Ca^{2+} , se decidió abordar el estudio de algunos aspectos de esta vía de señalización.

Para explorar la dependencia de la señal de Ca^{2+} se evaluó el papel de los canales de entrada de Ca^{2+} en la respuesta a ATP, el principal agonista activador de esta vía en cultivos musculares. Se empleó un protocolo con dos pulsos de ATP separados por 10 min de lavado, que permite aplicar durante éste diversos inhibidores y estimar con un control interno el efecto de estos tratamientos. La Figura 34 muestra registros representativos de las respuestas obtenidas. La respuesta fue ligera, pero significativamente menor, en el caso de los cultivos procedentes de donantes mayores (>60 años), pero no había disminución en la primera respuesta a ATP.

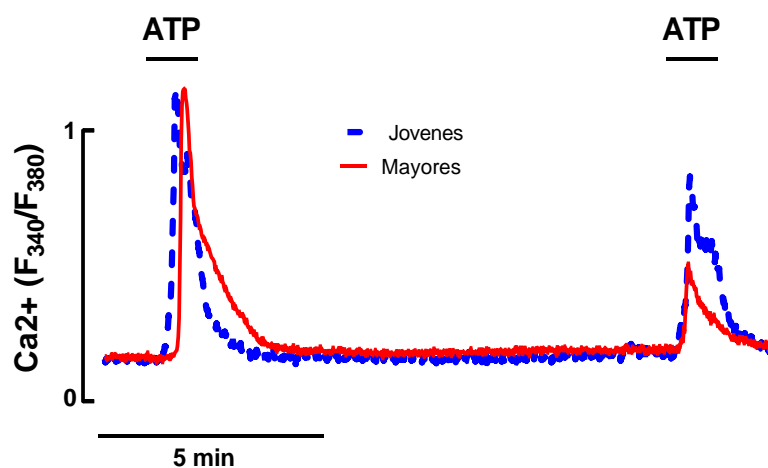


Figura 34 Registro representativo de la estimulación de células musculares humanas en cultivo con dos pulsos de ATP (500 μM)

Para evaluar la contribución de canales Cav1.x se realizaron experimentos aplicando nifedipina (1 μM) desde 3 minutos antes de la segunda estimulación. La Figura 35 muestra una reducción significativa en el caso de cultivos procedentes de individuos jóvenes, pero no para los procedentes de mayores. Esto sugiere una menor contribución o actividad de los canales Cav1.x en la respuesta a ATP con el avance del envejecimiento.

Al igual que los restantes tejidos, en el músculo esquelético se ha descrito la importancia funcional de la entrada capacitativa de Ca^{2+} mediada por las proteínas STIM1/Orai (Liou et al., 2005) en respuesta al vaciamiento de depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Dado que el ATP actúa sobre receptores P2Y que movilizan tales depósitos, se comprobó si la respuesta a ATP dependía en alguna medida de este mecanismo de homeostasis del Ca^{2+} . La Figura 35 muestra el efecto del tratamiento con el inhibidor específico de canales Orai GSK7975 (1 μM). Este redujo la respuesta al ATP en el caso de los cultivos procedentes de jóvenes, pero no en el caso de los de donantes mayores. Como este resultado sugiere que con el envejecimiento la respuesta a ATP pierde participación de la entrada de Ca^{2+} , probamos también el efecto de aplicar el ATP en una solución sin

Ca^{2+} extracelular (sin Ca^{2+} en su composición y con 1 mM EGTA). El efecto fue similar a lo observado en respuesta a los inhibidores de canales de entrada de calcio.

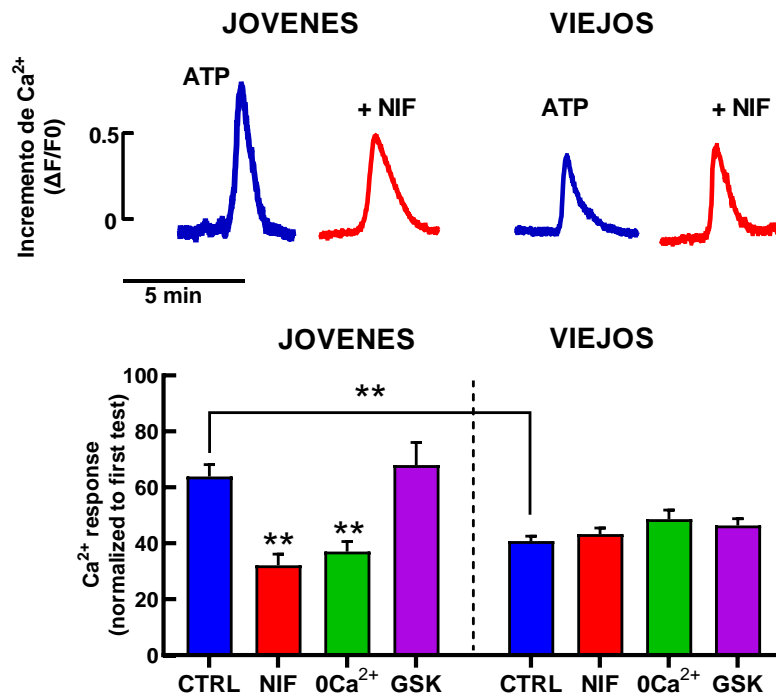


Figura 35. Efecto de la nifedipina (NIF 1 μM), medio libre de Ca^{2+} (0Ca^{2+} , 1 mM EGTA) y GSK7975 (1 μM) sobre la respuesta a ATP. Los registros superiores muestran la respuesta a ATP (500 μM) del segundo pulso del protocolo mostrado en la Figura 34. El histograma inferior representa los incrementos medios normalizados respecto al primer pulso de ATP. $n = 26-106$ células. ** $p < 0.01$ respecto grupo control (CTRL) o respecto Joven.

A continuación, se estudió el efecto del envejecimiento sobre la CCE, ya que los datos anteriores sugerían una posible alteración con la edad. La Figura 36 muestra el protocolo clásico de activación de la CCE en respuesta al tratamiento con tapsigargina (TPS; 1 μM), un inhibidor específico de la bomba PMCA del retículo sarcoplásmico, en ausencia de Ca^{2+} . Tras una elevación transitoria debida a la salida pasiva del calcio del depósito y su transporte al medio extracelular, la aplicación de un medio con Ca^{2+} produce una rápida entrada debido a que el vaciamiento de los depósitos activa los canales Orai. Esta entrada activada por los depósitos fue menor en los cultivos procedentes de mayores. La Figura 37 muestra que, como era de esperar, la aplicación de nuevo del inhibidor específico de Orai GSK7975 o la de otro compuesto específico con la misma actividad, el Synta 66 (S66; 1 μM) 5 min previamente a la entrada de Ca^{2+} redujo la CCE tanto en cultivos de jóvenes como de mayores, aunque el efecto fue mayor en jóvenes posiblemente debido a la mayor respuesta de base.

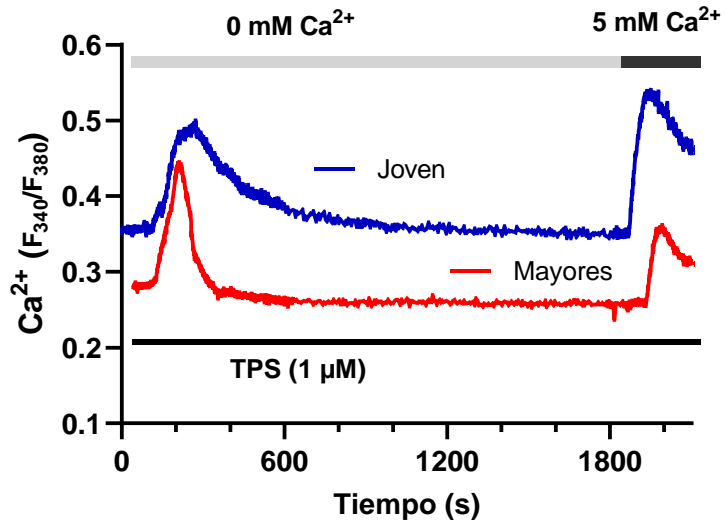


Figura 36. Activación farmacológica de la entrada capacitativa de Ca²⁺ en cultivos musculares humanas en respuesta a tapsigargina.

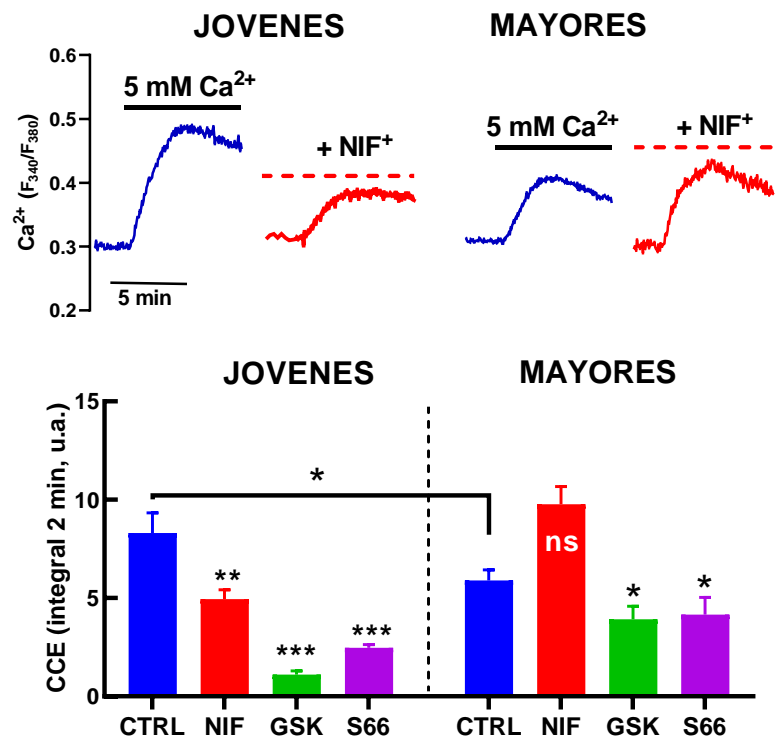


Figura 37. Efectos de nifedipina (NIF 1 μM), GSK7975 (1 μM) y Synta 66 (S66 1 μM) sobre la entrada capacitativa de calcio en cultivos de donantes de más y menos de 60 años de edad. N=26-79, * p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.005 respecto control (CTRL).

Previamente este laboratorio ha mostrado en músculo liso que durante el vaciamiento de los depósitos y la activación de la CCE se produce una despolarización que activa los canales de Ca^{2+} de tipo L (Cav1.x). Por ello, también realizamos experimentos en presencia de nifedipina. La Figura 38 muestra que la inhibición de canales Cav1.x inhibió la CCE en cultivos de donantes jóvenes pero no de mayores, en consonancia con lo observado en la respuesta al ATP.

Los datos anteriores sugieren que con el envejecimiento disminuye la funcionalidad o participación de los canales de calcio tipo L en la señal producida por ATP. Si la activación de los canales o el acoplamiento de éstos con los otros elementos de la señal están inhibidos en los cultivos procedentes de individuos mayores, la simple despolarización también debería reflejar una menor movilización de Ca^{2+} . Por tanto, realizamos experimentos con 2 aplicaciones rápidas de una solución despolarizante con 90 mM KCl separadas por 10 minutos (Figura 38). La respuesta a KCl no fue inferior en los cultivos de mayores; al contrario, la amplitud fue estadísticamente mayor que en los cultivos de donantes jóvenes ($0.583 \pm 0.031 \Delta F/F_0$ viejos, $n=144$, frente a 0.419 ± 0.03 , $n=61$ en jóvenes; $p<0.01$). En los cultivos envejecidos se produjo una reducción en el efecto de la nifedipina.

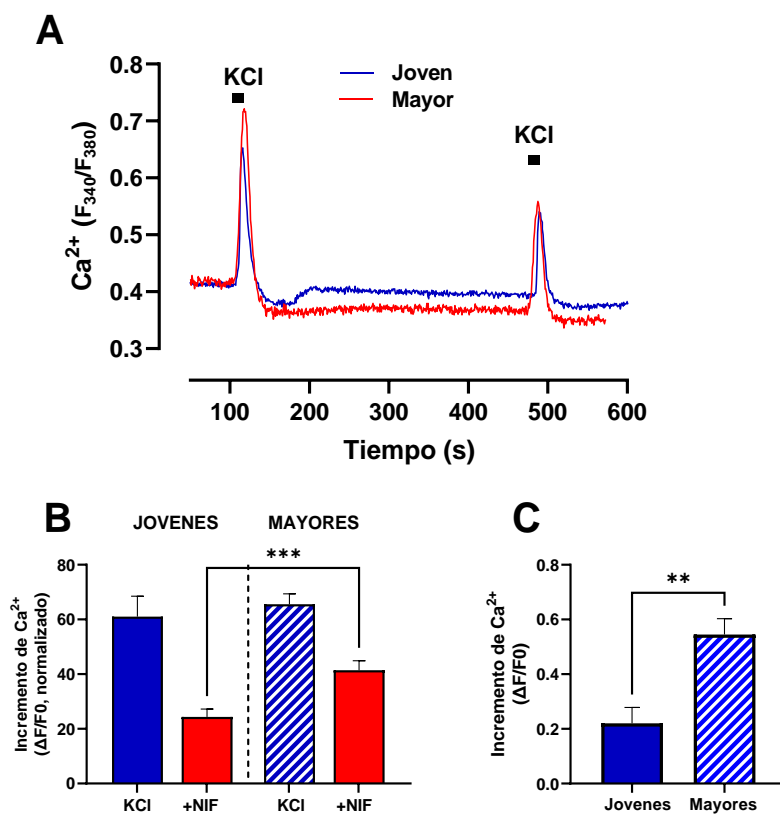


Figura 38. Movilización de Ca^{2+} en respuesta a la aplicación repetida de una solución despolarizante de KCl (90mM). A Registros representativos de la respuesta en cultivos de donantes jóvenes y mayores. B Efecto de la aplicación de nifedipina (NIF 1 μM) 3 minutos antes del segundo estímulo de KCl. Se representan los valores medios de la respuesta normalizados respecto al primer estímulo. $N= 33-95$ *** $p<0.005$, t de Student. C Respuesta a la aplicación de KCl en un medio libre de Ca^{2+} en células no estimuladas previamente. $N= 14$ y 56 para Jóvenes y Mayores, ** $p<0.01$ t de Student.

En una serie de experimentos adicional se compararon en los dos grupos de cultivo el efecto de la estimulación con KCl en medio libre de Ca^{2+} . Como puede observarse en la Figura 38, en cultivos de mayores la respuesta fue significativamente mayor que en cultivos de donantes jóvenes.

Para comprobar si con el envejecimiento se produce una disminución de la expresión de canales Cav1.x, se determinó la expresión relativa de la subunidad $\alpha 1$ de la proteína Cav1.x. La Figura 39 muestra el revelado del western blott con la expresión de Cav1.x en cultivos procedentes de jóvenes y de mayores de 60 años. Como puede observarse, no hubo diferencias entre ambos grupos de muestras.

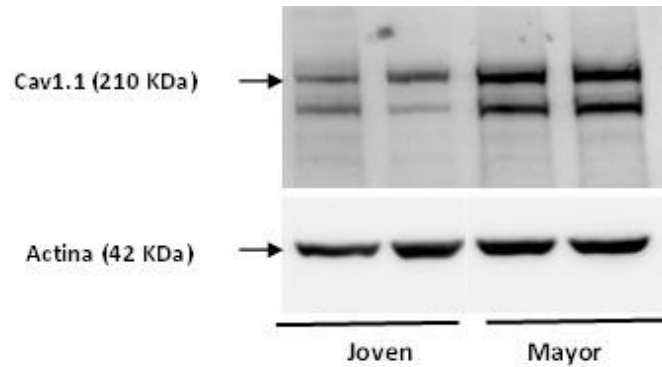


Figura 39. Expresión de la subunidad $\alpha 1$ de la proteína Cav1.x en cultivos musculares procedentes de 2 donantes jóvenes y 2 mayores de 60 años. Se muestra la actina como control de carga. Representativo de determinaciones en otros 4 cultivos de diferentes donantes de cada grupo de edad.

Dado que la panexina 1 ha sido propuesta como canal implicado en la señal de Ca^{2+} en estas células, decidimos comparar el efecto de su inhibidor, la carbenoxolona, en la respuesta a ATP en cultivos procedentes de donantes de los dos grupos de edad. Como puede verse en la Figura 40 el efecto de este inhibidor fue prácticamente nulo en los cultivos de mayores, indicando que la función global de este canal disminuye con la edad.

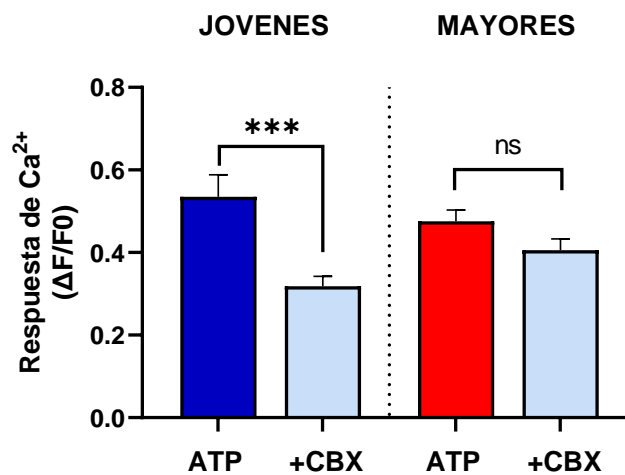


Figura 40. Efecto del inhibidor de panexina-1 carbenoxolona ($10 \mu\text{M}$) en la respuesta a ATP en cultivos procedentes de donantes jóvenes y mayores. N= 26-64. ***p<0.005, t de Student

DISCUSION

Los presentes resultados muestran que el envejecimiento reduce la entrada capacitativa de calcio y la participación de los canales de tipo L/Cav1.x en la señal de Ca^{2+} en cultivos musculares esqueléticos humanos en respuesta a ATP y despolarización. Esta alteración no se debe a pérdida de la expresión de los canales, y se asocia probablemente a una menor interacción con otros elementos de la señal de Ca^{2+} muscular.

Las condiciones experimentales parten de protocolos de doble pulso (para reducir la variabilidad de las respuestas de cultivos procedentes de diferentes individuos). Es probable que, dado que se emplean concentraciones máximas de agonistas, los depósitos intracelulares aún no se han repuesto completamente en el tiempo del protocolo, lo que explicaría la menor respuesta del segundo pulso. Puesto que el envejecimiento reduce la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Figura 37), eso podría explicar la menor respuesta en cultivos de donantes mayores.

Algunos estudios previos han mostrado que las señales de Ca^{2+} musculares se alteran con la edad (Weisleder et al., 2016) y el envejecimiento reduce en humanos la sensibilidad de las fibras a la señal de Ca^{2+} (Straight et al., 2018) y el contenido de Ca^{2+} del RS (Lamboley et al., 2016). Dado que las alteraciones genéticas y en la homeostasis proteica son rasgos distintivos del envejecimiento, una posibilidad para explicar las alteraciones es la pérdida o alteración en la expresión de las proteínas transportadora de Ca^{2+} (Delbono et al., 2011). Un estudio previo en cultivos musculares humanos muestra que con la edad del donante se reduce la entrada de Ca^{2+} a través de canales L (Luin et al., 2008). Sin embargo, los cambios observados en nuestras condiciones experimentales para los canales L no se deben a una menor expresión. Por el contrario, parecen deberse más a modificaciones en el acoplamiento con otros elementos de la señal. La nifedipina, el bloqueante prototípico de los canales Cav1.x, pierde efectividad en tres condiciones diferentes: durante la estimulación con un agonista acoplado a la vía fosfolipasa C/ IP_3 R, con la activación farmacológica de la entrada capacitativa y con la despolarización química (KCl).

En las células musculares adultas la despolarización procedente de la placa neuromuscular activa canales Cav1.x que al abrir, por acoplamiento conformacional, canales de rianodina (RyR) libera Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Este mecanismo va evolucionando en los miotubos en cultivo a medida que se produce la diferenciación de estas células (Weigl et al., 2000). En el caso de la entrada capacitativa, la despolarización que la acompaña (Morales et al., 2004), probablemente debida a la entrada de Ca^{2+} mediante canales Orai del músculo (Weigl et al., 2003; Darbellay et al., 2009) resultaría probablemente en una secuencia similar.

En el caso del ATP, principal estímulo en los cultivos musculares y mediador además del efecto de la despolarización, su efecto se debe mayoritariamente a receptores P2Y acoplados a fosfolipasa C (PLC) y depósitos intracelulares de Ca^{2+} activados por IP_3 (Buvinic 2009). La participación de canales L puede explicarse por la despolarización inducida por la entrada de Ca^{2+} mediante CCE, lo que a su vez ayudaría a liberar Ca^{2+} desde depósitos con canales de ryanodina (RyR). En nuestras condiciones experimentales, con un protocolo de doble pulso de ATP la respuesta se reduce en cultivos envejecidos a la vez que se pierde tanto contribución del calcio extracelular como participación del canal L (Figura 34), lo que sugiere que la respuesta se basa en depósitos intracelulares. Una

conclusión similar puede en el caso de la despolarización por KCl, que prácticamente pierde contribución del Ca^{2+} externo (Figura 38C).

Aparentemente el efecto del envejecimiento es por tanto un redireccionamiento del acoplamiento de los canales L con la maquinaria de control del Ca^{2+} intracelular. El envejecimiento podría alterar la regulación de los receptores RyR musculares (Gaboardi et al., 2018). Una posibilidad es que se reorienten a una mayor activación de los depósitos intracelulares. De hecho la respuesta a KCl en células intactas, sin estimulación previa, fue significativamente mayor que en cultivos jóvenes, a pesar de una menor contribución del calcio extracelular. Un mayor acoplamiento a depósitos de RyR podría explicar en parte este efecto del envejecimiento: las células despolarizadas aumentarían la salida de calcio de este depósito. Cuando se lleva a cabo la doble estimulación (Figura 38A-B) la menor sensibilidad a nifedipina podría deberse a esta mayor comunicación y al hecho de que las células de cultivos de mayores muestran una menor activación de la entrada capacitativa. Algo análogo podría ocurrir con la respuesta a ATP; en este caso podríamos esperar, como en el caso del KCl, que el envejecimiento aumente (o al menos no disminuya) la respuesta al ATP en células intactas.

El significado funcional de nuestros resultados podría estar relacionado con efectos a largo plazo de la señal de Ca^{2+} . La entrada capacitativa se ha relacionado con la proliferación y diferenciación (), lo que podría tener consecuencias sobre la capacidad de regeneración y mantenimiento del músculo. Por otra parte, estudios previos han comunicado cambios con la edad en el acoplamiento entre los depósitos y otros elementos como las mitocondrias, lo que podría tener consecuencias sobre el metabolismo (Lamboley et al., 2016).

Independientemente de las hipotéticas consecuencias que pudiera tener los cambios observados en nuestro estudio, es interesante llamar la atención sobre el origen o causa de tales cambios. Los cambios que se han descrito en la funcionalidad del músculo con el envejecimiento se han atribuido a factores sistémicos o del ambiente tisular o a modificaciones intrínsecas de las células musculares (Hwang y Brack et al., 2018, Sousa-Victor et al., 2014). Los datos presentados sugieren que es posible que las células madre acumulen cambios con la edad que puedan tener una expresión en su progenie celular, a pesar de que aparentemente los cultivos no muestren mayores diferencias en función de la edad.

RESULTADOS.CAPITULO V

RESULTADOS

Para estudiar la entrada de Mn^{2+} en respuesta a ES, se estudió la extinción de la fluorescencia de Fura-2 inducida por Mn^{2+} . La Figura 41 muestra rastros de fluorescencia de fura-2 antes, durante y después de la estimulación eléctrica (ES) a 20 Hz en fibras aisladas de FDB de ratón. La extinción es visible sólo en presencia de Mn^{2+} en la solución de Krebs-Ringer y sólo después de ES a 20 Hz. Los registros presentes en la Figura 40B muestran solo la parte del registro donde se produce la extinción de la fluorescencia siendo una medición del influjo de Mn^{2+} al final del período de estimulación o posterior a su cese. Cuando la ES se produjo a 90 Hz, no se produjo la extinción de la fluorescencia (Figura 41C), lo que indica que la ECCE depende de la frecuencia. En la Figura 41D se representa las estadísticas de 96 fibras individuales registradas en las condiciones citadas.

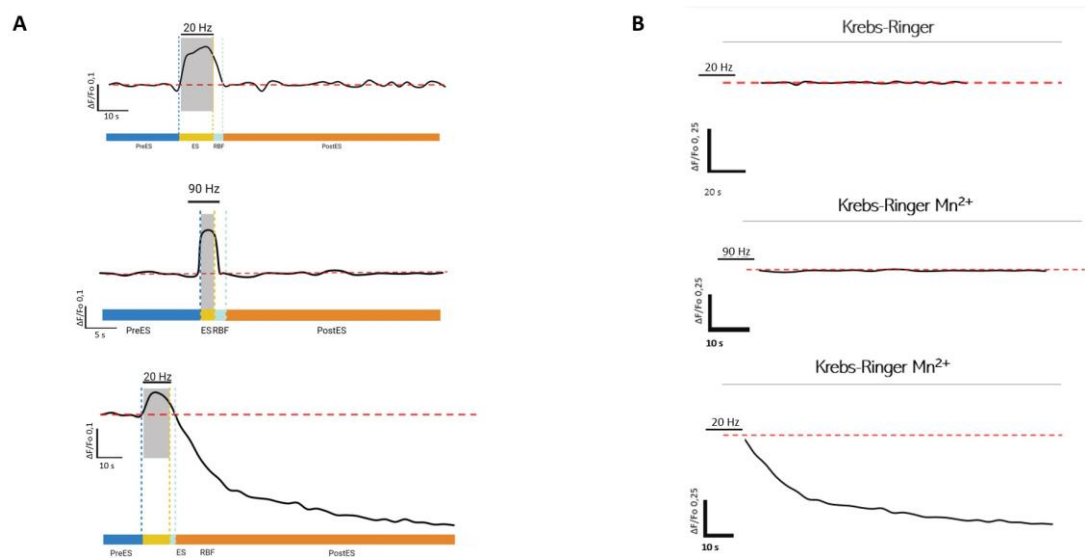


Figura 41. Mn^{2+} La extinción tras la estimulación eléctrica de las fibras musculares depende de la frecuencia. Las fibras musculares FDB se cargaron con Fura-2-AM y se estimularon eléctricamente con un tren de 270 pulsos, 0,3 ms cada uno en frecuencias altas (90 Hz) y bajas (20 Hz). Las secuencias de imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal y las series de imágenes grabadas se analizaron cuadro por cuadro utilizando el software Fiji, seleccionando una región de interés (ROI) en cada fibra observada. (A) Representación de la fluorescencia relativa obtenida de una sola fibra muscular estimulada eléctricamente a 20 Hz. La secuencia registrada se dividió en cuatro segmentos diferentes: PreES: estímulos preeléctricos (azul); ES: estímulos eléctricos (amarillo); RBF: retorno a la señal de fluorescencia basal (azul claro); PostES: Estímulos post-eléctricos (naranja). Los niveles de fluorescencia base se representan con una línea discontinua roja; La duración de los estímulos se muestra mediante un bloque gris con su frecuencia en la parte superior. (B) Grabación PostES de una sola fibra FDB. Superior: La fibra muscular en solución KR tradicional, estimulada eléctricamente a 20 hz muestra niveles de fluorescencia como la línea base. Medio: La fibra en solución KR Mn^{2+} estimulada a alta frecuencia (90 Hz) también muestra una señal fluorescente similar a una base. Inferior: la estimulación a bajas frecuencias promueve la entrada de manganeso que apaga la fluorescencia de Fura-2. La grabación del segmento Post ES muestra una disminución de la fluorescencia dependiente de la frecuencia de los estímulos.

Un ajuste exponencial de los datos de extinción muestra que múltiples fibras (Figura 42A) presentaron una respuesta relativamente rápida, con una constante de tiempo (τ) de menos de 10 s. Sin embargo, en torno a la mitad de las respuestas mostraron una cinética más lenta, con constantes de tiempo que se extendían a más de 20 segundos (valor medio de 40s). Esto sugiere que pueden ocurrir dos eventos de extinción en estas condiciones y, de hecho, algunos de los registros pueden ajustarse a una curva exponencial doble. La Figura 42B muestra los parámetros de ajuste exponencial (niveles τ y plateau) para registros obtenidos en diferentes fibras musculares y la agrupación de estos parámetros en un componente rápido y otro lento (Figura 42C).

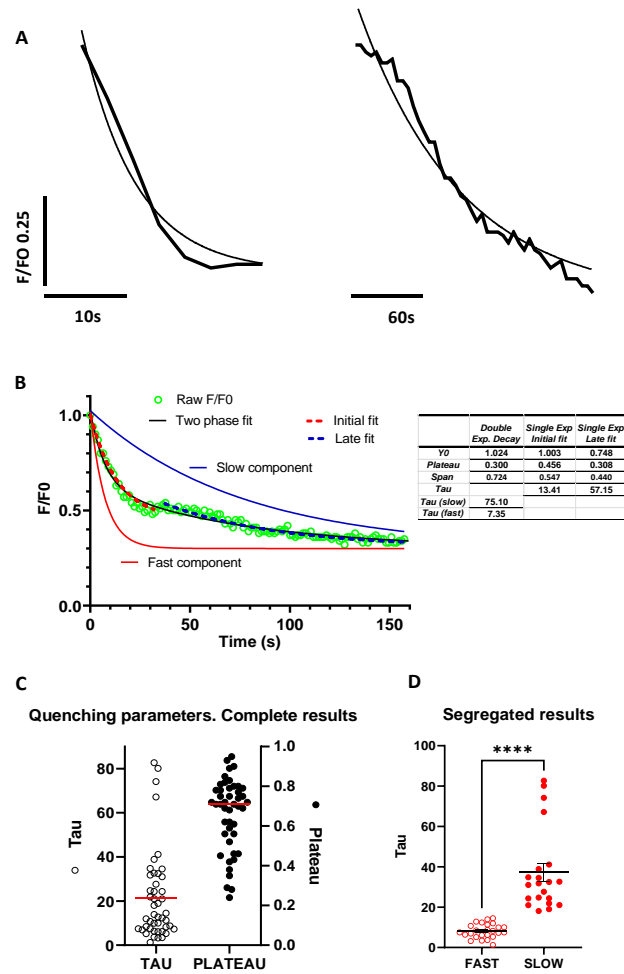


Figura 42. Cinética de la extinción de la fluorescencia de fura-2 inducida por Mn2+ en fibras de músculo esquelético de ratón adulto. A. Registros que muestran la disminución de la fluorescencia de fura-2 en fibras del flexor corto de los dedos en respuesta a un tren de 270 pulsos, 0,1 ms, 20 Hz. Las fibras se estimularon en Krebs Ringer que contenía Mn2+ 2 mM y no se añadió calcio. Los rastros muestran una disminución representativa de la fluorescencia rápida (registro de la izquierda) y lenta (registro de la derecha). La línea delgada es la caída exponencial ajustada. B Un trazo original que muestra el ajuste de una caída exponencial doble (línea negra continua). Las líneas continuas rojas y azules representan las fases inicial y tardía del decaimiento exponencial. Las líneas discontinuas rojas y azules representan la desintegración única ajustada separada para las partes inicial y tardía de los datos. Los parámetros de ajuste se muestran en la tabla del lado derecho. C. Parámetros de ajuste exponencial niveles τ y meseta (valores individuales y valores promedio) para todos los experimentos de control. Parámetro D τ (incluido el valor promedio y sem) para los mismos experimentos segregados en cinética rápida y lenta. (**** $p < 0,001$, prueba U de Mann Whitney).

Podría ser posible que la velocidad de entrada de Mn^{2+} se deba simplemente a una condición cuantitativa o numérica: cuando la permeabilidad al Ca^{2+} es más fuerte, se espera que la meseta de la curva (plateau) sea más baja y se necesitaría más tiempo para alcanzarla (lo que llevaría a una tau más alta). Sin embargo, encontramos una correlación muy baja entre tau y plateau (coeficiente de correlación de Spearman para meseta frente a tau -0,45); esto se confirmó además mediante una regresión de pendiente no significativamente diferente de cero ($p < 0,11$, intervalo del 95%: -79,5 – 8,8). Además, cuando el parámetro de plateau de los experimentos se separó siguiendo el criterio rápido/lento, no se dieron diferencias significativas en la amplitud de la extinción. Esto sugiere que la velocidad del influjo de Mn^{2+} está regulada por un mecanismo independiente de la amplitud del índice de permeabilidad.

Si la extinción de Mn^{2+} representa la entrada a través de los canales de panexina-1, esta extinción debería ser sensible a los fármacos que se sabe que regulan la actividad del canal. Un inhibidor conocido de los canales de panexina (y conexina) es la carbenoxolona. Cuando se incubaron las fibras musculares durante 30 min en presencia de carbenoxolona 5 μM (Figura 43A), el Mn^{2+} quedó completamente inhibido. Asimismo, la extinción de Mn^{2+} se inhibió con nifedipina 25 μM (Figura 43B), un inhibidor de dihidropiridina de $Ca_{v1.1}$, como se citó con anterioridad (apartado ECCE), y también se inhibió en presencia 10 μM del agonista de $Ca_{v1.1}$, BayK8644. (Figura 43C), que inhibe la extrusión de ATP a través de los canales de panexina 1 (Jorquera et al., 2013).

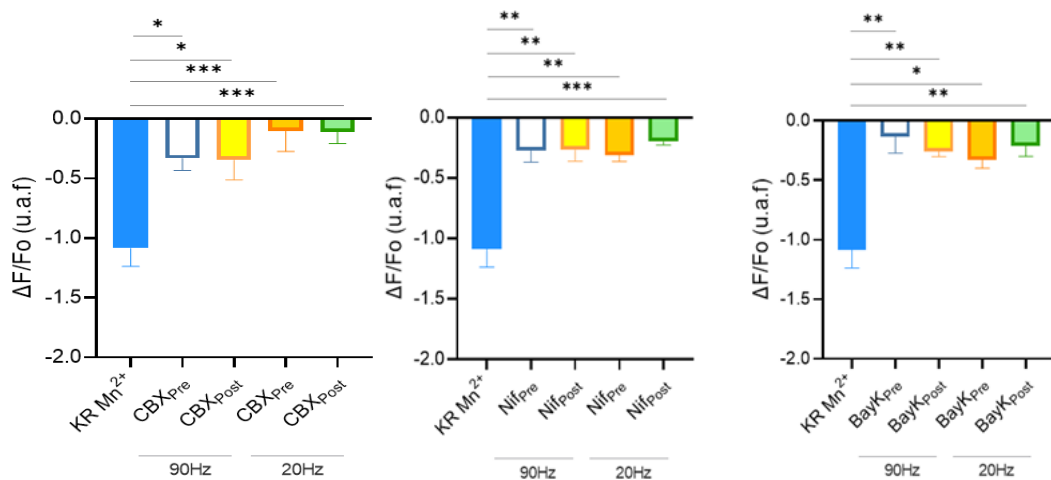


Figura 43. Efecto del modulador de panexina 1, carbenoxolona y dihidropiridinas, sobre la extinción de Mn^{2+} provocada por estimulación eléctrica. A) Fluorescencia relativa media de fibras incubadas en Krebs Ringer que contiene Mn^{2+} con y sin presencia de carbenoxolona (CBX). Las fibras se estimularon a 90 y 20 HZ como se indica (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). nKR $Mn^{2+}=40$, n KR $Mn^{2+} + CBX= 16$. B) Efecto de las dihidropiridinas Nifedipina (izquierda) y BayK 8644 (derecha). Fluorescencia relativa media de fibras incubadas en Krebs Ringer que contiene Mn^{2+} con y sin presencia de Nifedipino (Nif) estimuladas a 90 y 20 Hz (** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). Panel derecho, fibras incubadas en Krebs Ringer que contiene Mn^{2+} con y sin la presencia de (-) S-Bay K 8644 (BayK), estimuladas a 90 y 20 Hz (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$). nKR $Mn^{2+}=40$ nBayK= 16, nNif= 12.

Se estudió el efecto de las condiciones hiperpolarizantes en la activación del quenching tras una estimulación de 20 Hz. La Figura 44 muestra los efectos de las soluciones bajas en K^+ extracelular en respuesta a ES. La Figura 44B muestra como a concentraciones bajas de K^+ extracelular se indujo una disminución significativa en el número de fibras que respondieron a ES, que cayó del 80,55% en los medios de control (5mM K^+) al 34,78 y 56,25% en 1mM y 3mM K^+ respectivamente ($p < 0,002$, Chi-cuadrado 12,62).

Los registros representativos que se muestran en la Figura 44A indican que a bajas concentraciones de K^+ afecta se ve alterada la respuesta. Un análisis estadístico de la amplitud del influjo de Mn^{2+} mostró que las soluciones hiperpolarizantes aumentaron significativamente el plateau promedio de la respuesta de las fibras (ANOVA $p < 0,003$), tanto para experimentos de 1mM como para 3mM K^+ ($p < 0,005$ y 0,05, post ANOVA pruebas) (Figura 44C). Este efecto también estuvo presente para las respuestas segregadas rápidas (ANOVA $p < 0,02$; $p < 0,005$ y 0,05 para K^+ 1mM y 3mM). En el caso de las respuestas más lentas se observó el mismo patrón, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al pequeño número de fibras sensibles.

En cuanto a la velocidad de respuesta, el análisis ANOVA mostró que la concentración de K^+ extracelular no modificó la tau, ni para las respuestas agregadas ni para los datos segregados rápido/lento. En el caso de K^+ 3mM hubo un ligero efecto en el límite de significancia ($p < 0,05$, prueba t de una cola).

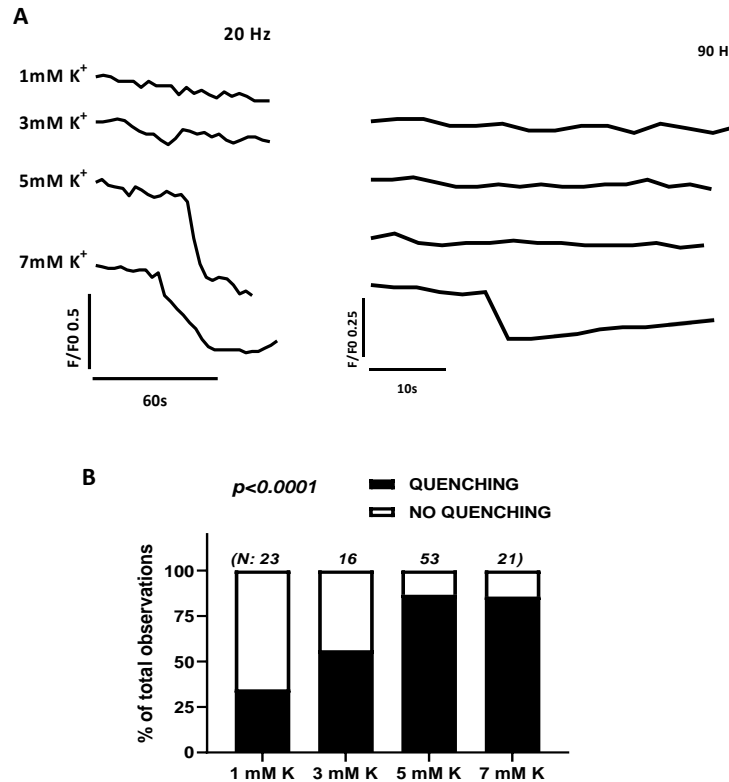


Figura 44. Efectos de la concentración alta y baja de potasio en la extinción provocada por ES en fibras musculares de ratón. Izquierda. Registros que muestran respuestas típicas a ES de 20 Hz en presencia de K⁺ de 1mM, 3mM, 5mM (condición de control) y 7mM. Derecha Registra en las mismas condiciones de K⁺ en respuesta a 90 Hz ES en presencia de 7 mM de K⁺ (representante de 12 a 21 fibras). Panel inferior. Histograma que representa proporciones normalizadas de células que responden y no responden (20 Hz) en condiciones de control y en presencia de diferentes concentraciones de K⁺. Los números encima de las barras representan el número real de experimentos.

En conjunto, nuestros datos indican que la activación de la entrada de Mn²⁺ se inhibe en condiciones de hiperpolarización. Por lo tanto, realizamos experimentos en un medio despolarizante suave que contiene K⁺ 7 mM. En esta condición experimental no pudimos registrar la extinción con Mn²⁺ de fura-2 en condiciones de estimulación de 20 Hz porque la duración del tren (270 pulsos, 0,1 ms, 13 segundos) siempre conducía a una fuerte contracción de la fibra, lo que imposibilitaba un registro apropiado de la fluorescencia.

Por tanto, llevamos a cabo una serie de experimentos utilizando ES a 90 Hz. La figura muestra que la estimulación de 90 Hz en la solución de control (K⁺ 5mM) induce un aumento sostenido de la fluorescencia debido a la contracción de la fibra (trazo medio). En presencia de 7mM de K⁺, la estimulación a 90 Hz provocó una extinción rápida (frecuentemente seguida por un aumento en la fluorescencia que coincidió con la contracción de la fibra y la finalización del registro), como se ilustra en el trazo superior de la Figura 44. La respuesta promedio de los 90 Hz en presencia de K⁺ 7mM se parecía a la activación de la vía de entrada de Ca²⁺ mostrada por experimentos de control a 20 Hz y K⁺ 5mM (trazo inferior de la Figura 44). En términos cuantitativos, 90 Hz en KCl 7mM se acercó al patrón observado para 20 Hz en K⁺ 3mM: el porcentaje de fibras sensibles fue

del 57 % (56 % para 20 Hz) y la meseta fue de 0,87 en comparación con 0,80 a 20 Hz 3mM K⁺.

DISCUSIÓN

Este estudio proporciona evidencias que presentan concordancia con la hipótesis de que, la entrada de calcio acoplada a la excitación (ECCE), descrita en las fibras del músculo esquelético, en realidad ocurre a través de los canales de panexina-1 que están regulados por Ca_v1.1. Hasta ahora, se ha demostrado que la liberación de ATP al medio extracelular después de la estimulación eléctrica se produce a través del canal de panexina-1 y está regulada por Cav1.1 (Buvinic et al., 2009, Casas et al., 2010, Jorquera et al., 2013). La liberación de ATP se produce en dos picos, uno rápido que alcanza su máximo en menos de 15 segundos y otro lento, que alcanza su máximo en más de 200 segundos (Jorquera et al., 2013). Este fenómeno depende de la frecuencia; siendo evidente después de trenes de estimulación de 20 Hz y estando ausente después de trenes de 90 Hz con el mismo número de pulsos. La liberación de ATP es inhibida por la carbenoxolona (un inhibidor de pannexin-1) y por las dihidropiridinas, el antagonista de Ca_v1.1, nifedipina y el agonista BAYK6644 (Jorquera et al., 2013).

La cinética de extinción de Mn²⁺ es compatible con la liberación de ATP. Se ha demostrado en este estudio que la ECCE se puede ajustar a una caída exponencial que puede ser rápida (constante de tiempo de menos de 10 s) o lenta (constante de tiempo de más de 40 s), compatible con el primer y segundo pico de liberación de ATP.

La ECCE depende de la frecuencia de estimulación de la misma manera que la liberación de ATP; está completamente ausente después de la estimulación a 20 Hz en condiciones normales y se observa con alta probabilidad cuando las fibras se estimulan a 20 Hz.

La farmacología de la ECCE es equivalente a la farmacología de la liberación de ATP. La inhibición por carbenoxolona indica que la entrada de Mn²⁺ se produce a través de canales de panexina y la inhibición por dihidropiridinas es evidencia de que el proceso (como liberación de ATP) está regulado por Ca_v1.1.

El hecho de que este importante mecanismo de acoplamiento excitación-transcripción pueda asociarse a ECCE abre la posibilidad de estudiar el funcionamiento de los canales de panexina-1 en el músculo esquelético y permite plantear preguntas cruciales que permitirán abordar este mecanismo. Una pregunta importante que abordamos aquí es la dependencia del potencial de membrana de ECCE y cómo el potencial de membrana puede ser determinante en el fenómeno dependiente de la frecuencia. De hecho, la ECCE depende críticamente del potencial de membrana y tanto una ligera hiperpolarización como despolarización, obtenidas al reducir o aumentar la concentración de K⁺ en la solución extracelular, reducen drásticamente la aparición de ECCE a 20 Hz. Curiosamente, cuando el potencial de membrana se fija en valores despolarizantes (7mM K⁺), la ECCE es evidente con una estimulación de 90 Hz, lo que sugiere que la aparición de ECCE (así como la dependencia de la frecuencia) está regulada por el potencial de membrana de las células musculares.

Podemos correlacionar la ECCE medida como extinción de Mn^{2+} con la liberación de ATP a través de canales de panexina-1 medidas fluorimétricamente. Hemos informado dos picos de liberación de ATP después de una estimulación eléctrica de 20 Hz (Jorquera et al., 2013). El primer pico de liberación de ATP de las fibras musculares ocurre en aproximadamente 10s y se corresponde bien con la respuesta rápida y más frecuente de extinción de Mn^{2+} ; El pico de liberación de ATP más lento ocurre entre 120 y 200s y es compatible con la respuesta más lenta observada en los experimentos realizados por este laboratorio (Jaimovich et al.2000).

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo inicial de esta tesis era detectar posibles alteraciones en la secreción de IL-6 y la señal de Ca^{2+} en cultivos musculares humanos preparados a partir de donantes de dos grupos de edad. De manera muy resumida, en las condiciones experimentales aplicadas no detectamos efectos de la edad en el primer parámetro, pero sí en el segundo.

La observación de una falta de efecto del envejecimiento en la secreción tiene diversas limitaciones en nuestras condiciones experimentales. Además del problema de tamaño muestral indicado en el capítulo I, es posible que los cambios esperables en la liberación de miocinas en el modelo planteado sean variables en función de la miocina estudiada. Dado el gran número de citocinas liberadas por este tejido, el envejecimiento podría afectar de manera diferencial a estos mensajeros intercelulares. Un tercer punto a tener en cuenta es que los estudios sobre envejecimiento y secreción de IL-6 *in vivo*, tanto en modelos animales como en humanos tienen dos grandes diferencias respecto a los basados en cultivos como el presente. Primero, recogen la secreción del músculo como órgano que, por una parte, contiene otros tejidos como grasa o vasos sanguíneos. Segundo, la secreción puede estar influida por tejidos y órganos distantes como depósitos grasos, hígado o sistema nervioso, que también liberan sustancias endocrinas que afectan al músculo. Si bien no hay duda de que las fibras del tejido muscular liberan IL-6 a la circulación (Peake et al., 2015), la segunda diferencia quizás pueda explicar, junto con las limitaciones expuestas en el Capítulo 1, la falta de efecto detectado en nuestras condiciones experimentales. Aunque el modelo aquí empleado es conocido por retener características propias del donante, la secreción de IL-6 está controlada por ejemplo por $\text{TNF}\alpha$ o IGF-1, que pueden provenir de otros tejidos. Además, un músculo adulto envejecido puede incluir elementos celulares no presentes en los cultivos primarios, adipocitos o células inmunológicas, y modificaciones del fenotipo celular diferentes a los de un cultivo.

En cualquier caso, el presente estudio sugiere que el hecho de que las células de origen de un cultivo presenten un rasgo fenotípico o epigenéticos de envejecimiento, como se ha descrito para células madre musculares envejecidas (Sousa-Victor et al., 2014; Hwang and Brack., 2018), no basta para convertir automáticamente el cultivo en una versión envejecida de un cultivo obtenido a partir de células madre jóvenes. Esto sugiere que el envejecimiento del músculo es el resultado tanto de factores intrínsecos a las células musculares como de influencias externas.

Los datos mostrados sobre la señal de Ca^{2+} indican que el envejecimiento modifica el fenotipo de esta vía de transducción en dos aspectos. Uno, incrementa en condiciones basales la respuesta de Ca^{2+} a la despolarización. Por otro, modifica o disminuye dos de los sistemas que conforman esta vía de señalización, la entrada capacitativa y la participación de los canales sensibles voltaje tipo L o $\text{Ca}_{v1.x}$. En el caso del primer efecto, hay precedentes de incrementos fruto del envejecimiento en otras células excitables como neuronas (Gant et al., 2014) o músculo liso (Gómez-Pinilla et al., 2011). Esto podría deberse a pérdida de *calcium binding capacity* de las células por defectos en la expresión de proteína de unión de calcio o por defectos en los sistemas de recaptación y extrusión. Más allá de su causa última, esto podría tener como consecuencia un menor control sobre la generación de señales de Ca^{2+} rápidas y restringidas subcelularmente, que en el músculo se denominan *sparks*. De hecho, se ha descrito una menor generación de *sparks* localizados en el músculo envejecido (Zhou et al., 2006). Esto a largo plazo podría tener un efecto acumulativo al degradarse la regulación fina de los múltiples procesos dependientes de

calcio, como son la proliferación y diferenciación o el metabolismo, como se ha propuesto por ejemplo en neuronas y alteraciones de procesos cognitivos (Toescu and Verkhatsky, 2007).

En el caso de los cambios aparentes en la función del canal Cav1.x, los datos presentados sugieren que podrían deberse a una alteración del acoplamiento de este canal con los canales de panexina-1. Los canales L/Cac1.x forman un complejo multifuncional con diversas proteínas que emplean esta proteína como sensor del voltaje. Además del clásico proceso de excitación-contracción, este esquema se ha extendido a un componente rápido de entrada de Ca^{2+} acoplada a la excitación que se sabe no mediado por el propio canal L (ECCE), y a la activación por calcio de procesos de transcripción genética (ECCT). Un déficit funcional del canal L en esta función podría tener especial relevancia a largo plazo, ya que podría contribuir a déficit de homeostasis de proteínas (un proceso que ha sido descrito por algunos autores en el músculo envejecido (Delbono, 2011). Una vez más, esto plantea la posibilidad de que pequeñas alteraciones, difíciles de detectar incluso experimentalmente, puedan tener consecuencias importantes a largo plazo.

Que en los cultivos musculares se produzca una alteración que depende de la edad del donante de las células madre precursoras podría indicar que estas células ya están envejecidas. Dado que en nuestras condiciones la expresión de los canales Cav1.x no se redujo con la edad del donante, es probable que el motivo de la alteración funcional sea cambios en expresión o función de alguna proteína reguladora. El envejecimiento muscular reduce el acoplamiento entre la proteína FKBP12 y los receptores de RyR, resultando en una menor movilización de Ca^{2+} desde los depósitos (Breckner et al., 2013). En células satélite humanas envejecidas se ha descrito un aumento de la proteína p16(INK4a). Sin embargo, esto redujo la capacidad regenerativa y proliferativa (Sousa-Victor et al., 2014), lo que no coincide con nuestras observaciones, ya que la proliferación de los mioblastos no estaba afectada en nuestras condiciones.

La presente tesis ha estudiado en detalle el papel de varios elementos de la vía de señalización del Ca^{2+} en la liberación de IL-6 por las células musculares en cultivo. Este aspecto había sido abordado previamente solo de una manera parcial, evaluando de manera separada solo algunos aspectos, siendo nuestro estudio el primero en describir el papel de los principales elementos en la liberación de esta miocina. Además, hemos descrito dos aspectos nuevos; el papel limitante de los canales operados por voltaje de tipo T o Cav3.x, y la acción de la señal de calcio a un nivel post-transcripcional. Lo primero sugiere que la liberación ocurre mediante exocitosis, ya que este tipo de canales no participa en nuestras condiciones experimentales en la señal de Ca^{2+} y es un conocido regulador de la fusión de vesícula en neuronas y células cromafines.

Acerca del efecto post-transcripcional de la señal de calcio, esto revela una regulación compleja de la secreción de IL-6 y no un simple flujo de información desde la respuesta de ATP y su señal de Ca^{2+} -hasta la transcripción, síntesis y liberación de IL-6. El efecto post-transcripcional, a pesar de que la transcripción es necesaria para su secreción (-datos no publicados de nuestro laboratorio y Bustamante et al., 2014-) indica que debe producirse alguna forma de autorregulación en la secreción de IL-6. En varios sistemas, incluyendo cultivos musculares de roedor (Bustamante et al., 2014), también se ha descrito un incremento de la concentración de ARNm de IL-6 al usar el inhibidor de transcripción cicloheximida (superinducción). Ese mismo efecto pudimos observar al

bloquear la señal de Ca^{2+} durante la estimulación con ATP. Esto podría deberse a que, una vez iniciada la transcripción de IL-6, si se bloquea o inhibe su secreción se produce una acumulación de ARNm bien sea por aumento de la estabilidad o por incremento o no inhibición de la transcripción desde ADN.

Aunque lo anterior esto está fuera de los objetivos del estudio, se cree que en combinación con los datos del Capítulo III muestran que la secreción de IL-6 presenta una autorregulación compleja. Los datos de esta memoria confirman que en cultivos musculares humanos la IL-6 ejerce una retroalimentación positiva, en consonancia con un artículo previo en cultivos de roedor (Bustamante et al., 2014) y con un estudio sobre el efecto de la infusión de IL-6 in vivo en humanos (Keller et al., 2003). Los resultados mostrados, además, se basan en determinación directa de la secreción mientras que la evidencia previa en este modelo y en otros tipos celulares proviene casi en su totalidad de la evaluación de la actividad de la vía de señalización STAT3, la ruta prototípica activada por esta miocina. Esta confirmación es importante, porque los resultados indican que es posible obtener experimentalmente una clara transcripción de ARNm sin la correspondiente secreción. Quedaría por responder la pregunta de si es posible que las células acumulen una cierta cantidad de IL-6 sintetizada sin liberar a la circulación.

El Capítulo III también caracteriza por primera vez, dentro de esta ruta de señalización ATP – IL-6, la participación de la endocitosis y el compartimento endosomal ácido en la retroalimentación en células musculares. La presencia de este mecanismo en diversos tejidos (revisado en Capítulo III) sugiere su importancia tanto en el control autocrino celular como en la regulación sistémica de esta citoquina. Si además consideramos que en el compartimento endocítico en células inmunes se ha revelado la presencia simultánea de un bucle de retroinhibición para la IL-6 (Verboogen et al., 2018), esto abre la posibilidad de que esta vía de autorregulación sea la responsable de controlar la secreción necesaria en diversas condiciones fisiológicas (actividad muscular de diversa intensidad y duración, regeneración o hipertrofia muscular) pero además participe en los incrementos excesivos que muestra en condiciones no fisiológicas, como respuestas inflamatorias o incremento de la secreción no estimulada durante el envejecimiento.

Por último, los resultados recogidos en la presente tesis aportan nuevas evidencias sobre el papel de los canales de panexina-1 en el mecanismo de ECCE. Es de destacar que ligeros cambios en la concentración extracelular de K^+ modifican el comportamiento de este mecanismo. Esto implica que las modificaciones del potencial del sarcolema que cabe esperar en diversas situaciones fisiológicas (excitación y recuperación posterior durante la activación por motoneuronas, respuesta a múltiples estímulos durante la miogénesis y reparación muscular) pueden ir modulando la entrada de Ca^{2+} a través de esta ruta.

CONCLUSIONES

1. Los cultivos celulares de músculo esquelético humano primarios no presentan diferencias significativas en su respuesta liberadora de IL-6 en respuesta a diversos agonistas de este modelo experimental
2. La secreción de IL-6 en respuesta al agonista fisiológico ATP precisa de señales de Ca^{2+} mediadas por canales de entrada de Ca^{2+} , depósitos intracelulares y por la activación subsecuente de la vía calmodulina/calcineurina. Los canales de voltaje tipo T tienen un papel limitante en la secreción de IL-6 en respuesta a ATP, probablemente por su papel facilitador de la exocitosis.
3. El efecto de la señal de Ca^{2+} ocurre en la fase post-transcripcional de la respuesta.
4. La IL-6 liberada por el ATP tiene un efecto de retroalimentación sobre la propia secreción de IL-6 que precisa de receptores de membrana, endocitosis y de un compartimento endosomal intacto.
5. El envejecimiento produce en los cultivos musculares primarios una inhibición de la entrada capacitativa de Ca^{2+} y una disminución en la funcionalidad de los canales L/Cav1.x.
6. La despolarización de fibras musculares adultas activa la entrada de Ca^{2+} mediante canales de panexina-1 modulados por el potencial de membrana plasmática

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abbracchio, M. P., & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology and Therapeutics*, 64(3), 445–475. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)00048-4](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)00048-4)

Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., ... Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 281–341. <https://doi.org/10.1124/PR.58.3.3>

Ackermann, M. A., & Kontogianni-Konstantopoulos, A. (2011). Myosin binding protein-C: A regulator of actomyosin interaction in striated muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/636403>

Akira, S., & Kishimoto, T. (1992). IL-6 and NF-IL6 in Acute-Phase Response and Viral Infection. *Immunological Reviews*, 127(1), 25–50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1992.tb01407.x>

Allen, D. G., Whitehead, N. P., & Froehner, S. C. (2015). Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: Roles of Ca²⁺, reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. *Physiological Reviews*, 96(1), 253–305. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2015>

Allen, D. L., Uyenishi, J. J., Cleary, A. S., Mehan, R. S., Lindsay, S. F., & Reed, J. M. (2010). Calcineurin activates interleukin-6 transcription in mouse skeletal muscle in vivo and in C2C12 myotubes in vitro. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 298(1), 198–211. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00325.2009>

Allen, R. E., & Boxhorn, L. K. (1989). Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *Journal of Cellular Physiology*, 138(2), 311–315. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041380213>

Anderson, C. R., & Stevens, C. F. (1973). Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 235(3), 655–691. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1973.SP010410>

Araya, R., Liberona, J. L., Cárdenas, J. C., Riveros, N., Estrada, M., Powell, J. A., ... Jaimovich, E. (2003). Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *Journal of General Physiology*, 121(1), 3–16. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028671>

Arias-Calderón, M., Almarza, G., Díaz-Vegas, A., Contreras-Ferrat, A., Valladares, D., Casas, M., ... Buvinic, S. (2016). Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle. *Skeletal Muscle*, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0087-5>

Austin, L., & Burgess, A. W. (1991). Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukaemia inhibitory factor and other cytokines. *Journal of the Neurological Sciences*, 101(2), 193–197. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(91\)90045-9](https://doi.org/10.1016/0022-510X(91)90045-9)

Austin, L., Bower, J., Kurek, J., & Vakakis, N. (1992). Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. *Journal of the Neurological Sciences*, 112(1–2), 185–191. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(92\)90149-F](https://doi.org/10.1016/0022-510X(92)90149-F)

F

Avila, G., de la Rosa, J. A., Monsalvo-Villegas, A., & Montiel-Jaen, M. G. (2020). Ca²⁺ channels mediate bidirectional signaling between sarcolemma and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Cells*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010055>

Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., ... Kurosaki, T. (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(45), 16704–16709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608358103>

Baldwin, J. M. (1994). of receptors coupled to G proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, *6*, 180–190.

Bannister, R. A., Pessah, I. N., & Beam, K. G. (2009). The skeletal L-type Ca²⁺ current is a major contributor to excitation-coupled Ca²⁺ entry. *Journal of General Physiology*, *133*(1), 79–91. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810105>

Banzet, S., Koulmann, N., Simler, N., Birot, O., Sanchez, H., Chapot, R., ... Bigard, X. (2005). Fibre-type specificity of interleukin-6 gene transcription during muscle contraction in rat: Association with calcineurin activity. *Journal of Physiology*, *566*(3), 839–847. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.089193>

Bao, L., Locovei, S., & Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Letters*, *572*(1–3), 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.009>

Bao, Y., Chen, Y., Ledderose, C., Li, L., & Junger, W. G. (2013). Pannexin 1 channels link chemoattractant receptor signaling to local excitation and global inhibition responses at the front and back of polarized neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(31), 22650–22657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.476283>

Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., ... Panchin, Y. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, *83*(4), 706–716. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.025>

Bareja, A., Holt, J. A., Luo, G., Chang, C., Lin, J., Hinken, A. C., ... Billin, A. N. (2014). Human and mouse skeletal muscle stem cells: Convergent and divergent mechanisms of myogenesis. *PLoS ONE*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090398>

Barros, D., Marques, E. A., Magalhães, J., & Carvalho, J. (2022). Energy metabolism and frailty: The potential role of exercise-induced myokines - A narrative review. *Ageing Research Reviews*, *82*. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2022.101780>

Baumgartner, R. N., Koehler, K. M., Gallagher, D., Romero, L., Heymsfield, S. B., Ross, R. R., ... Lindeman, R. D. (1998). Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American Journal of Epidemiology*, *147*(8), 755–763. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A009520>

Bazan, J. F. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Trends in Immunology*, *11*(C), 350–354.

Bazan, J. F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(18), 6934–6938. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.6934>

Bean, B. P. (1992). Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, *13*(C), 87–90. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90032-2)

Beard, N. A., Laver, D. R., & Dulhunty, A. F. (2004). Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *85*(1), 33–69. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.07.001>

- Becker, P. L., Singer, J. J., Walsh, J. V., & Fay, F. S. (1989). Regulation of calcium concentration in voltage-clamped smooth muscle cells. *Science*, *244*(4901), 211–214. <https://doi.org/10.1126/science.2704996>
- Benatti, F. B., & Pedersen, B. K. (2015). Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases - Myokine regulation. *Nature Reviews Rheumatology*, *11*(2), 86–97. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.193>
- Benham, B. Y. C. D., & Bolton, T. B. (1983). *Potassium Channels in Longitudinal Smooth Muscle Cells*. 469–486.
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(2). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A008342>
- Berchtold, M. W., Brinkmeier, H., & Müntener, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological Reviews*, *80*(3), 1215–1265. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1215>
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological Reviews*, *79*(4), 1127–1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1127>
- Bernareggi, A., Luin, E., Pavan, B., Parato, G., Sciancalepore, M., Urbani, R., & Lorenzon, P. (2015). Adenosine enhances acetylcholine receptor channel openings and intracellular calcium “spiking” in mouse skeletal myotubes. *Acta Physiologica*, *214*(4), 467–480. <https://doi.org/10.1111/apha.12473>
- Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Experimental Biology*, *200*(2), 315–319. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.2.315>
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, *341*(6239), 197–205. <https://doi.org/10.1038/341197a0>
- Bezanilla, F., Caputo, C., Gonzalez-Serratos, H., & Venosa, R. A. (1972). Sodium dependence of the inward spread of activation in isolated twitch muscle fibres of the frog. *The Journal of Physiology*, *223*(2), 507–523. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1972.SP009860>
- Biressi, S., Molinaro, M., & Cossu, G. (2007). Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Developmental Biology*, *308*(2), 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.06.006>
- Bischoff, R. (1986). A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Developmental Biology*, *115*(1), 140–147. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90235-6)
- Bivona, J. J., Mank, M. M., Stapleton, R. D., Files, D. C., Toth, M. J., & Poynter, M. E. (2022). Skeletal Muscle Myofibers Directly Contribute to LPS-Induced Systemic Inflammatory Tone. *Frontiers in Pharmacology*, *13*(June), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.917917>
- Blagosklonny, M. V. (2012). Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: Terminology for TOR-driven aging. *Aging*, *4*(3), 159–165. <https://doi.org/10.18632/aging.100443>
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*, *94*(1), 235–263. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Block, B. A., Imagawa, T., Campbell, K. P., & Franzini-Armstrong, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, *107*(6 II), 2587–2600. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.6.2587>

Boassa, D., Qiu, F., Dahl, G., & Sosinsky, G. (2008). Trafficking dynamics of glycosylated pannexin1 proteins. *Cell Communication and Adhesion*, 15(1–2), 119–132. <https://doi.org/10.1080/15419060802013885>

Bonner, T. I. (1989). The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends in Neurosciences*, 12(4), 148–151. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90054-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90054-4)

Boppart, M. D., Asp, S., Wojtaszewski, J. F. P., Fielding, R. A., Mohr, T., & Goodyear, L. J. (2000). Marathon running transiently increase c-Jun NH2-terminal kinase and p38 γ activities in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 526(3), 663–669. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00663.x>

Bottinelli, R., & Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: Molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 73(2–4), 195–262. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00006-7)

Boulanger, M. J., Chow, D. chone, Brevnova, E. E., & Garcia, K. C. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex. *Science*, 300(5628), 2101–2104. <https://doi.org/10.1126/science.1083901>

Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., ... Birnbaumer, L. (1999). Modulation of Ca²⁺ entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): Evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca²⁺ entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 14955–14960. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14955>

Boyersky, L. L. (1985). Department of Physiology and Biophysics at University of Kentucky. *The Physiologist*, 28(6), 482–484.

Breckner, A., Ganz, M., Marcellin, D., Richter, J., Gerwin, N., & Rausch, M. (2013). Effect of Calstabin1 depletion on calcium transients and energy utilization in muscle fibers and treatment opportunities with RyR1 stabilizers. *PLoS One*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081277>

Brooks, S. V. (2003). Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 27(1–4), 171–182. <https://doi.org/10.1152/advan.2003.27.4.171>

Brukman, N. G., Uygur, B., Podbilewicz, B., & Chernomordik, L. V. (2019). How cells fuse. *Journal of Cell Biology*, 218(5), 1436–1451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201901017>

Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., & Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13644–13649. <https://doi.org/10.1073/pnas.2233464100>

Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J. J., & Pessah, I. N. (1992). Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23560–23567. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)35875-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)35875-7)

Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., ... Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: From somite to limb. *Journal of Anatomy*, 202(1), 59–68. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00139.x>

Buraei, Z., & Yang, J. (2010). The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiological Reviews*, 90(4), 1461–1506. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2009>

Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*, 62(2), 491–503. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8)

Burnstock, G. (1978). Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Progress in Neurobiology*, 11(3–4), 205–222. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(78\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0301-0082(78)90013-8)

Burnstock, G. (1997). The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*, 36(9), 1127–1139. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00125-1)

Burnstock, G. (1998). Ralevic V, Burnstock G Receptor for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50 : 413-492. *Pharmacological Reviews*, 50(September), 413–492.

Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*, 87(2), 659–797. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>

Burnstock, G. (2009). Purinergic signalling: Past, present and future. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(1), 3–8. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008005000037>

Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 239821281881749. <https://doi.org/10.1177/2398212818817494>

Burnstock, G. (2020). Introduction to Purinergic Signaling. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2041, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_1

Burnstock, G., & Abbracchio, M. P. (2006). Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Autonomic Neuroscience*, 58(3), 281–341. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3.281>

Burnstock, G., & Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology*, 16(5), 433–440. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(85\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90001-1)

Bustamante, M., Fernández-Verdejo, R., Jaimovich, E., & Buvinic, S. (2014). Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca²⁺ signals and an IL-6 autocrine loop. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 306(8). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00450.2013>

Buvinic, S., Almaraz, G., Bustamante, M., Casas, M., López, J., Riquelme, M., ... Jaimovich, E. (2009). ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34490–34505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057315>

Calle-Ciborro, B., Espin-Jaime, T., Santos, F. J., Gomez-Martin, A., Jardin, I., Pozo, M. J., ... Camello-Almaraz, C. (2023). Secretion of Interleukin 6 in Human Skeletal Muscle Cultures Depends on Ca²⁺ Signalling. *Biology*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12070968>

Calvani, R., Joseph, A. M., Adihetty, P. J., Miccheli, A., Bossola, M., Leeuwenburgh, C., ... Marzetti, E. (2013). Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biological Chemistry*, 394(3), 393–414. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0247>

Camello, PJ, Camello-Almaraz, C., y Pozo, MJ. (2012). Pharmacological Approaches to Improve Ageing. En: *Pharmacology* (Ed L. Gallelli). InTech. doi: 10.5772/33389

Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., & Camello, P. J. (2008). Age-related alterations in Ca²⁺ signals and mitochondrial membrane potential in exocrine cells are prevented by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 45(2), 191–198. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00576.x>

Campiglio, M., & Flucher, B. E. (2015). The Role of Auxiliary Subunits for the Functional Diversity of Voltage-Gated Calcium Channels. *Journal of Cellular Physiology*, 230(9), 2019–2031. <https://doi.org/10.1002/jcp.24998>

Campion, D. R. (1984). The muscle satellite cell: A review. *International Review of Cytology*, VOL. 87, 225–251. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62444-4](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62444-4)

Canepari, M., Pellegrino, M. A., D'Antona, G., & Bottinelli, R. (2010). Skeletal muscle fibre diversity and the underlying mechanisms. *Acta Physiologica*, 199(4), 465–476. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02118.x>

Cantini et al., 1995. (1995). *IL-6 regulates proliferation of satellite cells.pdf*.

Carafoli, E., The, E. C., Cells, H., & Cardiology, C. (1985). Laboratory of Biochemistry , Swiss Federal Institute of Technology (E TH),. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 212.

Carbone, E., & Lux, H. D. (1984). Brief Communication a Low Voltage-Activated Calcium Conductance. *Biophysical Journal*, 46(August), 413–418.

Carbone, E., Calorio, C., & Vandael, D. H. F. (2014). T-type channel-mediated neurotransmitter release. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(4), 677–687. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1489-z>

Cardillo, P. (2001). La calorimetria di reazione per la sicurezza e lo sviluppo dei processi chimici. *Rivista Dei Combustibili*, 55(1), 43. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.011>. Murine

Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G., ... Febbraio, M. A. (2006). Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 55(10), 2688–2697. <https://doi.org/10.2337/db05-1404>

Carson, B. P. (2017). The potential role of contraction-induced myokines in the regulation of metabolic function for the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 8(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00097>

Casas, M., Figueroa, R., Jorquera, G., Escobar, M., Molgó, J., & Jaimovich, E. (2010). IP3-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *Journal of General Physiology*, 136(4), 455–467. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910397>

Catterall, W. . (2004). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 485–501.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 521–555. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.16.1.521>

Catterall, W. A. (2011). *Voltage-Gated Calcium Channels*. 1–24.

Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P., & Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacological Reviews*, 55(4), 579–581. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.8>

Centre, U. N., Sciences, B., Campus, U. A. S., Calcium, I., Before, S., & Academy, I. (2000). *Mini Review Mechanism of store-operated calcium entry*. 25(4).

Chandra, S., Kable, E. P. W., Morrison, G. H., & Webb, W. W. (1991). Calcium sequestration in the Golgi apparatus of cultured mammalian cells revealed by laser scanning confocal microscopy and ion microscopy. *Journal of Cell Science*, 100(4), 747–752. <https://doi.org/10.1242/jcs.100.4.747>

Chargé, S. B. P., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*, 84(1), 209–238. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00019.2003>

- Charlton, C. A., Mohler, W. A., Radice, G. L., Hynes, R. O., & Blau, H. M. (1997). Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture. *Journal of Cell Biology*, *138*(2), 331–336. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.2.331>
- Chen, J. C. J., & Goldhamer, D. J. (2003). Skeletal muscle stem cells. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, *1*. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-101>
- Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L., Swaim, W., & Ambudkar, I. S. (2011). Local Ca²⁺ entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca²⁺ signals required for specific cell functions. *PLoS Biology*, *9*(3), 26–34. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001025>
- Cherednichenko, G., Hurne, A. M., Fessenden, J. D., Lee, E. H., Allen, P. D., Beam, K. G., & Pessah, I. N. (2004). Conformational activation of Ca²⁺ entry by depolarization of skeletal myotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15793–15798. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403485101>
- Chiarandini, B. Y. D. J. (1980). BY D. J. CHIARANDINI*, J. A. SANCHEZ† AND E. STEFANI† From the. 153–163.
- Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F. J., ... Gherardi, R. K. (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(4), 1397–1409. <https://doi.org/10.1091/MBC.E06-08-0693>
- Christ, B., & Ordahl, C. P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anatomy and Embryology*, *191*(5), 381–396. <https://doi.org/10.1007/BF00304424>
- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, *80*(2), 259–268. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90408-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90408-5)
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clark, B. C., Yin, Y. H., Liu, J. Y. W., Välimäki, M., Zhang, X., Huang, P., ... Rueda, R. (2020). Falls among older adults with sarcopenia dwelling in nursing home or community: A meta-analysis. *Clinical Nutrition*, *39*(1), 1121–1132.
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C., & Gregorio, C. C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *18*, 637–706. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840>
- Colman, R. F. (1975). Mechanisms for the oxidative decarboxylation of isocitrate: implications for control. *Advances in Enzyme Regulation*, *13*(C), 413–433. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(75\)90028-X](https://doi.org/10.1016/0065-2571(75)90028-X)
- Conboy, I. M., & Rando, T. A. (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Developmental Cell*, *3*(3), 397–409. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00254-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00254-X)
- Conboy, I. M., & Rando, T. A. (2012). Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *11*(12), 2260–2267. <https://doi.org/10.4161/CC.20437>
- Cornelison, D. D. W., Olwin, B. B., Rudnicki, M. A., & Wold, B. J. (2000). MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Developmental Biology*, *224*(2), 122–137. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9682>
- Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, M., & Vaughan, D. M. (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *266*(6 35-6). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.6.c1485>

Corti, S., Salani, S., Del Bo, R., Sironi, M., Strazzer, S., D'Angelo, M. G., ... Scarlato, G. (2001). Chemotactic factors enhance myogenic cell migration across an endothelial monolayer. *Experimental Cell Research*, 268(1), 36–44. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5267>

Coyle, E. F., Coggan, A. R., Hemmert, M. K., & Ivy, J. L. (1986). Muscle glycogen utilization during prolonged strenuous exercise when fed carbohydrate. *Journal of Applied Physiology*, 61(1), 165–172. <https://doi.org/10.1152/jap.1986.61.1.165>

Crabtree, G. R. (1999). Generic Signals and Specific Outcomes. *Cell*, 96(5), 611–614. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80571-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80571-1)

Csernoch, L., & Jacquemond, V. (2015). Phosphoinositides in Ca²⁺ signaling and excitation–contraction coupling in skeletal muscle: an old player and newcomers. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 36(6), 491–499. <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9422-4>

Cueni, L., Canepari, M., Adelman, J. P., & Lüthi, A. (2009). Ca²⁺ signaling by T-type Ca²⁺ channels in neurons. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 457(5), 1161–1172. <https://doi.org/10.1007/S00424-008-0582-6>

Cueni, L., Canepari, M., Adelman, J. P., & Lüthi, A. (2009). Ca²⁺ signaling by T-type Ca²⁺ channels in neurons. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 457(5), 1161–1172. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0582-6>

Curtis, B. M., & Catterall, W. A. (1985). Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(8), 2528–2532. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.8.2528>

Dahl, R., Larsen, S., Dohmann, T. L., Qvortrup, K., Helge, J. W., Dela, F., & Prats, C. (2015). Three-dimensional reconstruction of the human skeletal muscle mitochondrial network as a tool to assess mitochondrial content and structural organization. *Acta Physiologica*, 213(1), 145–155. <https://doi.org/10.1111/apha.12289>

Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C. R., König, S., & Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *Journal of Cell Biology*, 194(2), 335–346. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012157>

Darbellay, B., Arnaudeau, S., König, S., Jousset, H., Bader, C., Demareux, N., & Bernheim, L. (2009). STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 5370–5380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806726200>

Dayal, A., Schrötter, K., Pan, Y., Föhr, K., Melzer, W., & Grabner, M. (2017). The Ca²⁺ influx through the mammalian skeletal muscle dihydropyridine receptor is irrelevant for muscle performance. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00629-x>

Delbono, O., O'Rourke, K. S., & Ettinger, W. H. (1995). Excitation-calcium release uncoupling in aged single human skeletal muscle fibers. *The Journal of Membrane Biology*, 148(3), 211–222. <https://doi.org/10.1007/BF00235039>

Delbono, O. (2011). Expression and regulation of excitation-contraction coupling proteins in aging skeletal muscle. *Current Aging Science*, 4(3), 248–259. <https://doi.org/10.2174/1874609811104030248>

Dirksen, R. T. (2009). Checking your SOCCs and feet: The molecular mechanisms of Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 587(13), 3139–3147. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172148>

Dirksen, R. T., Eisner, D. A., Eduardo, R., & Sipido, K. R. (2022). *Excitation – Contraction Coupling Excitation – contraction coupling in cardiac , skeletal , and smooth muscle*. 154(9), 9–11.

do for the nicotinic has accumulated that the nico- What does phosphorylation is phosphorylated in vivo ~ and that acetylcholine. (1987). 61–64.

Doherty, T. J. (2001). The influence of aging and sex on skeletal muscle mass and strength. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 4(6), 503–508. <https://doi.org/10.1097/00075197-200111000-00007>

Doles, J. D., & Olwin, B. B. (2014). The impact of JAK-STAT signaling on muscle regeneration. *Nature Medicine*, 20(10), 1094–1095. <https://doi.org/10.1038/nm.3720>

Dolmetsch, R. E., Xu, K., & Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392(6679), 933–936. <https://doi.org/10.1038/31960>

Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 169–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>

Dourdin, N., Balcerzak, D., Brustis, J. J., Poussard, S., Cottin, P., & Ducastaing, A. (1999). Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Experimental Cell Research*, 246(2), 433–442. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4325>

Drexler, H. C. A., Ruhs, A., Konzer, A., Mendler, L., Bruckskotten, M., Loosos, M., ... Brauns, T. (2012). On marathons and sprints: An integrated quantitative proteomics and transcriptomics analysis of differences between slow and fast muscle fibers. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(6), 1–16. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010801>

Drury, A. N., & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology*, 68(3), 213–237. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>

Dubyak, G. R., & el-Moatassim, C. (1993). Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *The American Journal of Physiology*, 265(3 Pt 1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.3.c577>

Ducreux, S., Zorzato, F., Müller, C., Sewry, C., Muntoni, F., Quinlivan, R., ... Treves, S. (2004). Effect of ryanodine receptor mutations on interleukin-6 release and intracellular calcium homeostasis in human myotubes from malignant hyperthermia-susceptible individuals and patients affected by central core disease. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43838–43846. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403612200>

Duman, R., & Voleti, B. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.073.Structure>

Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M. C., & Rudnicki, M. A. (2015). Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1027–1059. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140068>

Ehrlich, B. E., Kaftan, E., Bezprozvannaya, S., & Bezprozvanny, I. (1994). The pharmacology of intracellular Ca(2+)-release channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15(5), 145–149. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0165-6147(94)90074-4)

Eisner, D. A., & Lederer, W. J. (1985). Na-Ca exchange: Stoichiometry and electrogenicity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 17(2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1985.248.3.c189>

El-Haggag, S. M., Hegazy, S. K., M. Abd-Elsalam, S., & Bahaa, M. M. (2022). Open-label pilot study of ethosuximide as adjunctive therapy for relieving abdominal pain related to Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 47(3), 306–312. <https://doi.org/10.1111/JCPT.13556>

Eltit, J. M., Garcí, A. A., Hidalgo, J., Liberona, J. L., Chiong, M., Lavandero, S., ... Jaimovich, E. (2006). Membrane electrical activity elicits inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent slow Ca²⁺ signals through a Gβγ/phosphatidylinositol 3-kinase γ pathway in skeletal myotubes. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(17), 12143–12154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511218200>

Epstein, H. F., & Fischmxan, D. a. (1991). Protein Development. *Structure*.

Erlinge, D., & Burnstock, G. (2008). P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signalling*, *4*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11302-007-9078-7>

Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., ... Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, *25*(3), 533–535. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81057-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81057-0)

Eton & Lepore, & M. Pahor, Manini, and M. C. (2008). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.078>. Myofibrillar

Exeter, D., & Connell, D. A. (2010). Skeletal muscle: Functional anatomy and pathophysiology. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*, *14*(2), 97–105. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253154>

Fang, C., Cai, X., Hayashi, S., Hao, S., Sakiyama, H., Wang, X., ... Sheng, J. (2019). Caffeine-stimulated muscle IL-6 mediates alleviation of non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1864*(3), 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.12.003>

Farmawati, A., Kitajima, Y., Nedachi, T., Sato, M., Kanzaki, M., & Nagatomi, R. (2013). Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes. *Endocrine Journal*, *60*(2), 137–147. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0316>

FEBBRAIO, M. A., & PEDERSEN, B. K. (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *The FASEB Journal*, *16*(11), 1335–1347. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0876rev>

Fernández-Morales, J. C., Fernando Padín, J., Vestring, S., Musial, D. C., De Diego, A. M. G., & García, A. G. (2015). Blockade by NNC 55-0396, mibefradil, and nickel of calcium and exocytotic signals in chromaffin cells: Implications for the regulation of hypoxia-induced secretion at early life. *European Journal of Pharmacology*, *751*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.025>

Fernández-Verdejo, R., Casas, M., Galgani, J. E., Jaimovich, E., & Buvinic, S. (2014). Exercise sensitizes skeletal muscle to extracellular ATP for IL-6 expression in mice. *International Journal of Sports Medicine*, *35*(4), 273–279. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1353147>

Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., & Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, *279*(5356), 1528–1530. <https://doi.org/10.1126/science.279.5356.1528>

Ferrucci, L., Corsi, A., Lauretani, F., Bandinelli, S., Bartali, B., Taub, D. D., ... Longo, D. L. (2005). The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*, *105*(6), 2294–2299. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-07-2599>

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., ... Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, *441*(7090), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>

Filigheddu, N., Gnocchi, V. F., Coscia, M., Cappelli, M., Porporato, P. E., & Taulli, R. (2007). Santiago M. Di Pietro,* Juan M. Falco ´n-Pe ´rez,* Danie `le Tenza,† Subba R.G.

Setty,‡ Michael S. Marks,‡ Grac ,a Raposo,† and Esteban C. Dell'Angelica*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(December), 986–994. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>

Fischer, C. P., Gleeson, M., Mcfarlin, B., Flynn, M., Smith, T. P., Kennedy, S. L., ... Woods, J. A. (2006). *IMMUNOLOGY From the Editors in medically complex patients*.

Fleischer, S., Ogunbunmi, E. M., Dixon, M. C., & Fleer, E. A. M. (1985). Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(21), 7256–7259. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.21.7256>

Flucher, B. E., & Tuluc, P. (2017). How and why are calcium currents curtailed in the skeletal muscle voltage-gated calcium channels? *Journal of Physiology*, 595(5), 1451–1463. <https://doi.org/10.1113/JP273423>

Flück, M., & Hoppeler, H. (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 146, 159–216. <https://doi.org/10.1007/s10254-002-0004-7>

Franchimont, N., Rydzziel, S., & Canalis, E. (1997). Interleukin 6 is autoregulated by transcriptional mechanisms in cultures of rat osteoblastic cells. *Journal of Clinical Investigation*, 100(7), 1797–1803. <https://doi.org/10.1172/JCI119707>

Franzini-Armstrong, C. (1973). Studies of the Triad. *The Journal of Cell Biology*, 56(1), 120–128. <https://doi.org/10.1083/jcb.56.1.120>

Franzini-Armstrong, C., & Jorgensen, A. O. (1994). Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annual Review of Physiology*, 56, 509–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.002453>

Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., & Tijskens, P. (2005). The assembly of calcium release units in cardiac muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1047, 76–85. <https://doi.org/10.1196/annals.1341.007>

Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J., ... McBurnie, M. A. (2001). Frailty in older adults: Evidence for a phenotype. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(3), 146–157. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.m146>

Fried, S. K., Bunkin, D. A., & Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(3), 847–850. <https://doi.org/10.1210/jc.83.3.847>

Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behavior Genetics*, 45(2), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>

Frost, R. A., Nystrom, G. J., & Lang, C. H. (2002). Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 283(3 52-3), 698–709. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00039.2002>

Frost, R. A., Nystrom, G. J., & Lang, C. H. (2004). Epinephrine stimulates IL-6 expression in skeletal muscle and C 2C12 myoblasts: Role of c-Jun NH2-terminal kinase and histone deacetylase activity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 286(5 49-5), 809–817. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00560.2003>

Fuchs, F., & Briggs, F. N. (1968). The site of calcium binding in relation to the activation of myofibrillar contraction. *The Journal of General Physiology*, 51(5), 655–676. <https://doi.org/10.1085/jgp.51.5.655>

Furuichi, Y., Manabe, Y., Takagi, M., Aoki, M., & Fujii, N. L. (2018). Evidence for acute contraction-induced myokine secretion by C2C12 myotubes. *PLoS ONE*, *13*(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206146>

Gaboardi, A. J., Kressler, J., Snow, T. K., & Balog, E. M. (2018). Aging impairs regulation of ryanodine receptors from extensor digitorum longus but not soleus muscles. *Muscle & Nerve*, *57*(6), 1022–1025. <https://doi.org/10.1002/MUS.26063>

Gach, M. P., Cherednichenko, G., Haarmann, C., Lopez, J. R., Beam, K. G., Pessah, I. N., ... Allen, P. D. (2008). A2Δ1 Dihydropyridine Receptor Subunit Is a Critical Element for Excitation-Coupled Calcium Entry But Not for Formation of Tetrads in Skeletal Myotubes. *Biophysical Journal*, *94*(8), 3023–3034. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.118893>

Galizzi, J. P., Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M., & Lazdunski, M. (1986). Characterization and photoaffinity labeling of receptor sites for the Ca²⁺ channel inhibitors d-cis-diltiazem, (±)-bepridil, desmethoxyverapamil, and (+)-PN 200-110 in skeletal muscle transverse tubule membranes. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(3), 1393–1397. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36105-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36105-7)

Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M. G., Bjornson, C., Coletta, M., ... Vescovi, A. L. (2000). Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nature Neuroscience*, *3*(10), 986–991. <https://doi.org/10.1038/79924>

Galpin, A. J., Raue, U., Jemiolo, B., Trappe, T. A., Harber, M. P., Minchev, K., & Trappe, S. (2012). Human skeletal muscle fiber type specific protein content. *Analytical Biochemistry*, *425*(2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.018>

Ganitkevich, V. Y. (1999). Clearance of large Ca²⁺ loads in a single smooth muscle cell: Examination of the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake and intracellular pH. *Cell Calcium*, *25*(1), 29–42. <https://doi.org/10.1054/ceca.1998.0001>

Gant, J. C., Blalock, E. M., Chen, K. C., Kadish, I., Porter, N. M., Norris, C. M., ... Landfield, P. W. (2014). FK506-binding protein 1b/12.6: a key to aging-related hippocampal Ca²⁺ dysregulation? *European Journal of Pharmacology*, *739*(C), 74–82. <https://doi.org/10.1016/J.EJP.2013.10.070>

Garbers, C., Thaiss, W., Jones, G. W., Waetzig, G. H., Lorenzen, I., Guilhot, F., ... Scheller, J. (2011). Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(50), 42959–42970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.295758>

Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Flamant, P., Gomès, D., Zammit, P. S., & Tajbakhsh, S. (2007). A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Developmental Biology*, *312*(1), 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.059>

Gelfi, C., Vasso, M., & Cerretelli, P. (2011). Diversity of human skeletal muscle in health and disease: Contribution of proteomics. *Journal of Proteomics*, *74*(6), 774–795. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.028>

German, C. L., Sauer, B. M., & Howe, C. L. (2011). The STAT3 beacon: IL-6 recurrently activates STAT 3 from endosomal structures. *Experimental Cell Research*, *317*(14), 1955–1969. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.009>

Geyer, B. C., Ben Ari, S., Barbash, S., Kilbourne, J., Mor, T. S., & Soreq, H. (2012). Nicotinic stimulation induces Tristetraprolin over-production and attenuates inflammation in muscle. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1823*(2), 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.001>

Glund, S., Treebak, J. T., Long, Y. C., Barres, R., Viollet, B., Wojtaszewski, J. F., & Zierath, J. R. (2009). Role of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in interleukin-

6 release from isolated mouse skeletal muscle. *Endocrinology*, 150(2), 600–606. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1204>

Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., & Camello, P. J. (2011). Aging differentially modifies agonist-evoked mouse detrusor contraction and calcium signals. *Age*, 33(1), 81–88. <https://doi.org/10.1007/s11357-010-9163-7>

Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., Baba, A., Matsuda, T., & Camello, P. J. (2007). Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 74(6), 860–869. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.037>

Gonnet, F., Bouazza, B., Millot, G. A., Ziaei, S., Garcia, L., Butler-Browne, G. S., ... Svinartchouk, F. (2008). Proteome analysis of differentiating human myoblasts by dialysis-assisted two-dimensional gel electrophoresis (DAGE). *Proteomics*, 8(2), 264–278. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700261>

González-Serratos, H. (1971). Inward spread of activation in vertebrate muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 212(3), 777–799. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1971.SP009356>

Gordon, A. M., Homsher, E., & Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews*, 80(2), 853–924. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>

Grabner, M., Dirksen, R. T., Suda, N., & Beam, K. G. (1999). The II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor is responsible for the Bi-directional coupling with the ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21913–21919. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21913>

Greaser, M. L., & Gergely, J. (1971). Reconstitution of troponin activity from three protein components. *Journal of Biological Chemistry*, 246(13), 4226–4233. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)62075-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)62075-7)

Greaser, M. L., & Gergely, J. (1973). Purification and properties of the components from tropinin. *Journal of Biological Chemistry*, 248(6), 2125–2133. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)44195-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)44195-1)

Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6046), 1109–1112. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1201940>

Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., ... Sotiropoulos, A. (2012). Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metabolism*, 15(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.001>

Gunning, P., O'Neill, G., & Hardeman, E. (2008). Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiological Reviews*, 88(1), 1–35. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2007>

Günther, S., Kim, J., Kostin, S., Lepper, C., Fan, C. M., & Braun, T. (2013). Myf5-Positive Satellite Cells Contribute to Pax7-Dependent Long-Term Maintenance of Adult Muscle Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 13(5), 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.07.016>

HAEGEMAN, G., CONTENT, J., VOLCKAERT, G., DERYNCK, R., TAVERNIER, J., & FIER, W. (1986). Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *European Journal of Biochemistry*, 159(3), 625–632. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09931.x>

Hager, K., Machein, U., Krieger, S., Platt, D., Seefried, G., & Bauer, J. (1994). Interleukin-6 and selected plasma proteins in healthy persons of different ages. *Neurobiology of Aging*, 15(6), 771–772. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0197-4580(94)90066-3)

Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., & Thomas, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, 82(3), 415–424. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90430-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90430-1)

Hansen, M. B. (2020). Interleukin-6 signaling requires only few IL-6 molecules: Relation to physiological concentrations of extracellular IL-6. *Immunity, Inflammation and Disease*, 8(2), 170–180. <https://doi.org/10.1002/IID3.292>

Harden, T. K., Boyer, J. L., & Nicholas, R. A. (1995). P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35(1), 541–579. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PA.35.040195.002545>

Helge, J. W., Stallknecht, B., Pedersen, B. K., Galbo, H., Kiens, B., & Richter, E. A. (2003). The effect of graded exercise of IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 546(1), 299–305. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.030437>

Hellstern, S., Pegoraro, S., Karim, C. B., Lustig, A., Thomas, D. D., Moroder, L., & Engel, J. (2001). Sarcolipin, the Shorter Homologue of Phospholamban, Forms Oligomeric Structures in Detergent Micelles and in Liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30845–30852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102495200>

Henningsen, J., Rigbolt, K. T. G., Blagoev, B., Pedersen, B. K., & Kratchmarova, I. (2010). Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(11), 2482–2496. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.002113>

Hernández-Ochoa, E. O., Pratt, S. J. P., Lovering, R. M., & Schneider, M. F. (2016). Critical role of intracellular RyR1 calcium release channels in skeletal muscle function and disease. *Frontiers in Physiology*, 6(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00420>

Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63(6), 1149–1157. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90411-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90411-7)

Hindi, S. M., & Kumar, A. (2016). Toll-like receptor signalling in regenerative myogenesis: Friend and foe. *Journal of Pathology*, 239(2), 125–128. <https://doi.org/10.1002/path.4714>

Hindi, S. M., Tajrishi, M. M., & Kumar, A. (2013). *Good for Review*. 6(272), 1–10.

Hirano, T., Matsuda, T., & Nakajima, K. (1994). Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells*, 12(3), 262–277. <https://doi.org/10.1002/stem.5530120303>

Hirano, T., Nakajima, K., & Hibi, M. (1997). Signaling mechanisms through gp130: A model of the cytokine system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 8(4), 241–252. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(98\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(98)80005-1)

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., ... Kishimoto, T. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324(6092), 73–76. <https://doi.org/10.1038/324073a0>

Hiscock, N., Chan, M. H. S., Bisucci, T., Darby, I. A., & Febbraio, M. A. (2004). Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. *The FASEB Journal*, 18(9), 992–994. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1259fje>

Hockerman, G. H., Peterson, B. Z., Johnson, B. D., & Catterall, W. A. (1997). Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 361–396. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.361>

Hofmann, F., Biel, M., & Flockerzi, V. (1994). Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annual Review of Neuroscience*, 17(Table 1), 399–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.002151>

Hogan, G. P., Lewis, S. R., & Rao, A. (2010). Orai2 and Orai3 exhibit strong sequence similarity to Orai1 (Hogan p 2010. *Genomics*, 16(10), 537–545. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132550.Molecular>

Horstick, E. J., Linsley, J. W., Dowling, J. J., Hauser, M. A., McDonald, K. K., Ashley-Koch, A., ... Kuwada, J. Y. (2013). Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. *Nature Communications*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms2952>

Hosey, M. M. (1992). Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *The FASEB Journal*, 6(3), 845–852. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.6.3.1740234>

Hostrup, M., Knudsen, J. G., Kristensen, C. M., Jessen, S., Pilegaard, H., & Bangsbo, J. (2022). Beta2-agonist increases skeletal muscle interleukin 6 production and release in response to resistance exercise in men. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 32(7), 1099–1108. <https://doi.org/10.1111/sms.14171>

Hotamisligil, G. S. (1999). *Endocrinology & Diabetes Mechanisms of TNF--induced insulin resistance*. 107, 119–125.

Hu, J., Shi, D., Ding, M., Huang, T., Gu, R., Xiao, J., ... Liao, H. (2019). Calmodulin-dependent signalling pathways are activated and mediate the acute inflammatory response of injured skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 597(21), 5161–5177. <https://doi.org/10.1113/JP278478>

Huang, C. L. H., Pedersen, T. H., & Fraser, J. A. (2011). Reciprocal dihydropyridine and ryanodine receptor interactions in skeletal muscle activation. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 32(3), 171–202. <https://doi.org/10.1007/s10974-011-9262-9>

Huang, W., Cane, M. C., Mukherjee, R., Szatmary, P., Zhang, X., Elliott, V., ... Sutton, R. (2017). Caffeine protects against experimental acute pancreatitis by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated Ca²⁺ release. *Gut*, 66(2), 301–313. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309363>

Hui, A., Ellinor, P. T., Krizanova, O., Wang, J. D., Diebold, R. J., & Schwartz, A. (1991). Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the $\alpha 1$ subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Neuron*, 7(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90072-8)

Hunter, S. K., Thompson, M. W., Ruell, P. A., Harmer, A. R., Thom, J. M., Gwinn, T. H., & Adams, R. D. (1999). Human skeletal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and muscle function with aging and strength training. *Journal of Applied Physiology*, 86(6), 1858–1865. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.6.1858>

Hurne, A. M., O'Brien, J. J., Wingrove, D., Cherednichenko, G., Allen, P. D., Beam, K. G., & Pessah, I. N. (2005). Ryanodine receptor type 1 (RyR1) mutations C4958S and C4961S reveal excitation-coupled calcium entry (ECCE) is independent of sarcoplasmic reticulum store depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 36994–37004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506441200>

Huxley, H. E. (1983). *Department of Biochemistry, Nagasaki University School of*. 16, 185–218.

Hwang, A. B., & Brack, A. S. (2018). Muscle Stem Cells and Aging. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 126). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.08.008>

Ichinoseki-Sekine, N., Yoshihara, T., Kakigi, R., Ogura, Y., Sugiura, T., & Naito, H. (2012). Fiber-type specific expression of α -actinin isoforms in rat skeletal muscle. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications, 419(2), 401–404.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.034>

Ikemoto, N., Antoniu, B., Kang, J. J., Mészáros, L. G., & Ronjat, M. (1991). Intravesicular Calcium Transient during Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum. *Biochemistry*, 30(21), 5230–5237. <https://doi.org/10.1021/bi00235a017>

Ikemoto, N., Ronjat, M., Mészáros, L. G., & Koshita, M. (1989). Postulated Role of Calsequestrin in the Regulation of Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum. *Biochemistry*, 28(16), 6764–6771. <https://doi.org/10.1021/bi00442a033>

Im, S. (2015). *Activation and deactivation of gene expression by Ca²⁺ + / calcineurin-NFAT-mediated signaling Molecules Activation and Deactivation of Gene Expression by.* (August).

Ito, N., Ruegg, U. T., & Takeda, S. (2018). ATP-induced increase in intracellular calcium levels and subsequent activation of mTOR as regulators of skeletal muscle hypertrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms19092804>

Jacobson, K. a. (2010). P2X and P2Y Receptors. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*, 33, 1–15.

Jaimovich, E., Reyes, R., Liberona, J. L., Powell, J. a, Bkaily, G., Avedanian, L., ... Libe-, J. L. (2012). IP 3 receptors , IP 3 transients , and nucleus-associated Ca²⁺ signals in cultured skeletal muscle Ca²⁺ signals in cultured skeletal muscle. *Most*, 998–1010.

Jaque-fernandez, F., Jorquera, G., Troc-gajardo, J., Pietri-rouxel, F., Gentil, C., & Buvinic, S. (2021). *Pannexin-1 and Ca^v1.1 show reciprocal interaction during excitation – contraction and excitation – transcription coupling in skeletal muscle.* 153(12), 1–13.

Javan, R., Horvath, J. J., Case, L. E., Austin, S., Corderi, J., Dubrovsky, A., ... Bashir, M. R. (2013). Generating color-coded anatomic muscle maps for correlation of quantitative magnetic resonance imaging analysis with clinical examination in neuromuscular disorders. *Muscle and Nerve*, 48(2), 293–295. <https://doi.org/10.1002/mus.23780>

Jayasinghe, I. D., & Launikonis, B. S. (2013). Three-dimensional reconstruction and analysis of the tubular system of vertebrate skeletal muscle. *Journal of Cell Science*, 126(17), 4048–4058. <https://doi.org/10.1242/jcs.131565>

Jeevakumar, V., Al Sardar, A. K., Mohamed, F., Smithhart, C. M., Price, T., & Dussor, G. (2020). IL-6 induced upregulation of T-type Ca²⁺ currents and sensitization of DRG nociceptors is attenuated by MNK inhibition. *Journal of Neurophysiology*, 124(1), 274–283. <https://doi.org/10.1152/JN.00188.2020>

Jiang, X., Lautermilch, N. J., Watari, H., Westenbroek, R. E., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2008). Modulation of Ca_v2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin- dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 341–346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710213105>

Jorgensen, A. O., Kalnins, V. I., Zubrzycka, E., & MacLennan, D. H. (1977). Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures. *Journal of Cell Biology*, 74(1), 287–298. <https://doi.org/10.1083/jcb.74.1.287>

Jorgensen, A. O., Shen, A. C. Y., & Campbell, K. P. (1985). Ultrastructural localization of calsequestrin in adult rat atrial and ventricular muscle cells. *Journal of Cell Biology*, 101(1), 257–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.1.257>

Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras-Ferrat, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., ... Casas, M. (2013). Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult

skeletal muscle plasticity. *Journal of Cell Science*, 126(5), 1189–1198. <https://doi.org/10.1242/jcs.116855>

Jorquera, G., Meneses-Valdés, R., Rosales-Soto, G., Valladares-Ide, D., Campos, C., Silva-Monasterio, M., ... Casas, M. (2021). Correction to: High extracellular ATP levels released through pannexin-1 channels mediate inflammation and insulin resistance in skeletal muscle fibres of diet-induced obese mice (*Diabetologia*, (2021), 64, 6, (1389–1401), 10.1007/s00125-021-05418-2). *Diabetologia*, 64(6), 1457. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05451-1>

Juretić, N., García-Huidobro, P., Iturrieta, J. A., Jaimovich, E., & Riveros, N. (2006). Depolarization-induced slow Ca²⁺ transients stimulate transcription of IL-6 gene in skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 290(5), 1428–1437. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00449.2005>

Kalinkovich, A., & Livshits, G. (2015). Sarcopenia - The search for emerging biomarkers. *Ageing Research Reviews*, 22, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.05.001>

Kami, K., & Senba, E. (2002). In vivo activation of STAT3 signaling in satellite cells and myofibers in regenerating rat skeletal muscles. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(12), 1579–1589. <https://doi.org/10.1177/002215540205001202>

Kamimura, D., Ishihara, K., & Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. In *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* (Vol. 149). <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0012-2>

Kang, C., Chung, E., Diffie, G., & Ji, L. L. (2013). Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: Role of PGC-1 α . *Experimental Gerontology*, 48(11), 1343–1350. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.08.004>

Kang, S., Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2019). Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity*, 50(4), 1007–1023. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.026>

Karalaki, M., Fili, S., Philippou, A., & Koutsilieris, M. (2009). Muscle regeneration: Cellular and molecular events. *In Vivo*, 23(5), 779–796.

Kaufmann, U., Kirsch, J., Irintchev, A., Wernig, A., & Starzinski-Powitz, A. (1999). The M-cadherin catenin complex interacts with microtubules in skeletal muscle cells: Implications for the fusion of myoblasts. *Journal of Cell Science*, 112(1), 55–67. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.1.55>

Keller, C., Hellsten, Y., Steensberg, A., & Klarlund Pedersen, B. (2006). Differential regulation of IL-6 and TNF- α via calcineurin in human skeletal muscle cells. *Cytokine*, 36(3–4), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.10.014>

Keller, P., Keller, C., Carey, A. L., Jauffred, S., Fischer, C. P., Steensberg, A., & Pedersen, B. K. (2003). Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: Autocrine regulation by IL-6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(2), 550–554. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.048>

Kerr, J. P., Ward, C. W., & Bloch, R. J. (2014). Dysferlin at transverse tubules regulates Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle. *Frontiers in Physiology*, 5 MAR(March), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00089>

Kim, G., & Kim, J. H. (2020). Namgok Lecture 2019: Impact of Skeletal Muscle Mass on Metabolic Health. *Endocrinology and Metabolism*, 35(1), 1–6.

Kim, J. H., Ren, Y., Ng, W. P., Li, S., Son, S., Kee, Y. S., ... Chen, E. H. (2015). Mechanical Tension Drives Cell Membrane Fusion. *Developmental Cell*, 32(5), 561–573. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.005>

Kishimoto, T. (2005). Interleukin-6: From basic science to medicine - 40 Years in immunology. *Annual Review of Immunology*, 23, 1–21. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806>

Kislinger, T., Gramolini, A. O., Pan, Y., Rahman, K., MacLennan, D. H., & Emili, A. (2005). Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4(7), 887–901. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400182-MCP200>

Klymenko, O., Brecklinghaus, T., Dille, M., Springer, C., de Wendt, C., Altenhofen, D., ... Kabra, D. G. (2020). Histone deacetylase 5 regulates interleukin 6 secretion and insulin action in skeletal muscle. *Molecular Metabolism*, 42(August), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101062>

Knight, G. E. (2009). Purinergic Receptors. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1245–1252. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00693-8>

Kollcaku, J. (2022). *The Role of Pannexin-1 Channel- Review*. 7(10), 931–934.

Krauss, R. S., Joseph, G. A., & Goel, A. J. (2017). Keep your friends close: Cell–cell contact and skeletal myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029298>

Kristiansen, S., Gade, J., Wojtaszewski, J. F. P., Kiens, B., & Richter, E. A. (2000). Glucose uptake is increased in trained vs. untrained muscle during heavy exercise. *Journal of Applied Physiology*, 89(3), 1151–1158. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.3.1151>

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>

Kuang, S., Chargé, S. B., Seale, P., Huh, M., & Rudnicki, M. A. (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *Journal of Cell Biology*, 172(1), 103–113. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508001>

Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., & Rudnicki, M. A. (2007). Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell*, 129(5), 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.044>

Kurtenbach, S., Prochnow, N., Kurtenbach, S., Klooster, J., Zoidl, C., Dermietzel, R., ... Zoidl, G. (2013). Pannexin1 Channel Proteins in the Zebrafish Retina Have Shared and Unique Properties. *PLoS ONE*, 8(10), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077722>

Kwakye, G. F., Li, D., Kabobel, O. A., & Bowman, A. B. (2011). Cellular fura-2 Manganese Extraction Assay (CFMEA). *Current Protocols in Toxicology*, 2651(SUPPL.48), 1–26. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1218s48>

LaBarge, M. A., & Blau, H. M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, 111(4), 589–601. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01078-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01078-4)

Lai, F. A., Misra, M., Xu, L., Smith, H. A., & Meissner, G. (1989). The Ryanodine Receptor-Ca²⁺ Release Channel Complex of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16776–16785. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)84773-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)84773-7)

Lambley, C. R., Wyckelsma, V. L., Mckenna, M. J., Murphy, R. M., & Lamb, G. D. (2016). Ca²⁺ leakage out of the sarcoplasmic reticulum is increased in type I skeletal muscle fibres in aged humans. *The Journal of Physiology*, 594(2), 469–481. <https://doi.org/10.1113/JP271382>

Lauritzen, H. P. M. M., Brandauer, J., Schjerling, P., Koh, H. J., Treebak, J. T., Hirshman, M. F., ... Goodyear, L. J. (2013). Contraction and AICAR stimulate IL-6 vesicle depletion

from skeletal muscle fibers in vivo. *Diabetes*, 62(9), 3081–3092. <https://doi.org/10.2337/db12-1261>

Lehka, L., & Rędowicz, M. J. (2020). Mechanisms regulating myoblast fusion: A multilevel interplay. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 104(January), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.02.004>

Lev, Shaya; Katz, Ben; Minke, B. (2012). *Do not distribute*. © 2012 Landes Bioscience. 23(August), 903–913. <https://doi.org/10.4161/cam.20753>

Lieber, R. (2002). *Skeletal muscle structure, function, and plasticity*. Retrieved from [https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=T0fbq_b89cAC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Lieber,+R.+L.+\(2009\).+Skeletal+muscle+structure,+function,+and+plasticity.&ots=jm27-97rTF&sig=YH8khFGfg1Y6ldiiTwcocoAlERQ](https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=T0fbq_b89cAC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Lieber,+R.+L.+(2009).+Skeletal+muscle+structure,+function,+and+plasticity.&ots=jm27-97rTF&sig=YH8khFGfg1Y6ldiiTwcocoAlERQ)

Lilliu, E., Koenig, S., Koenig, X., & Frieden, M. (2021). Store-operated calcium entry in skeletal muscle: What makes it different? *Cells*, 10(9), 1–31. <https://doi.org/10.3390/cells10092356>

Lin, G. G., & Scott, J. G. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(6), 628–633. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2215059/pdf/nihms36360.pdf>

Lin, P., Yao, Y., Hofmeister, R., Tsien, R. Y., & Gist Farquhar, M. (2000). Overexpression of CALNIN (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca²⁺ storage in the Golgi. *Journal of Cell Biology*, 145(2), 279–289. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.2.279>

Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. Do, Jones, J. T., Myers, J. W., James, E., ... Meyer, T. (2011). *NIH Public Access*. 15(13), 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>

Liu, Q., Chen, W., Fan, X., Wang, J., Fu, S., Cui, S., ... Wan, Y. (2019). Upregulation of interleukin-6 on Ca^v3.2 T-type calcium channels in dorsal root ganglion neurons contributes to neuropathic pain in rats with spinal nerve ligation. *Experimental Neurology*, 317(February), 226–243. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.03.005>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lluís, F., Perdiguero, E., Nebreda, A. R., & Muñoz-Cánoves, P. (2006). Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends in Cell Biology*, 16(1), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.11.002>

Locovei, S., Bao, L., & Dahl, G. (2006). Pannexin 1 in erythrocytes: Function without a gap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7655–7659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601037103>

Lohman, A. W., Weaver, J. L., Billaud, M., Sandilos, J. K., Griffiths, R., Straub, A. C., ... Isakson, B. E. (2012). S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39602–39612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397976>

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

Lotze, M. T., Zeh, H. J., Rubartelli, A., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Washburn, N. R., ... Billiar, T. (2007). The grateful dead: Damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological Reviews*, 220(1), 60–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00579.x>

Low, A. M., Kwan, C. Y., & Daniel, E. E. (1992). Evidence for two types of internal Ca²⁺ stores in canine mesenteric artery with different refilling mechanisms. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 262(1), 31–41. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.262.1.h31>

Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M., & Lewis, R. S. (2007). Channel Activation. *Nature*, 454(7203), 538–542. <https://doi.org/10.1038/nature07065>. Oligomerization

Luin, E., Lorenzon, P., Wernig, A., & Ruzzier, F. (2008). Calcium current kinetics in young and aged human cultured myotubes. *Cell Calcium*, 44(6), 554–566. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.04.002>

MacAluso, F., & Myburgh, K. H. (2012). Current evidence that exercise can increase the number of adult stem cells. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 33(3–4), 187–198. <https://doi.org/10.1007/s10974-012-9302-0>

Mackiewicz, A., Schooltink, H., (Baltimore, P. H.-..., 1950, M. ., & 1992, undefined. (n.d.). Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *Journals.Aai.OrgA Mackiewicz, H Schooltink, PC Heinrich, S Rose-JohnJournal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1992•journals.Aai.Org*. Retrieved from <https://journals.aai.org/jimmunol/article-abstract/149/6/2021/41646>

MacLennan, D. H., Rice, W. J., & Green, N. M. (1997). The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28815–28818. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.46.28815>

Makris, A. C., Sotzios, Y., Zhou, Z., Makropoulou, M., Papapetropoulos, N., Zacharatos, P., ... Vassilakopoulos, T. (2010). Nitric oxide stimulates interleukin-6 production in skeletal myotubes. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 30(5), 321–327. <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0022>

Malm, C., Nyberg, P., Engstr, M., Sj, B., Lenkei, R., Ekblom, B., & Lundberg, I. (2000). Muscular adaptation to physical stress is of significant importance for normal muscular development and function. Without stimulation from physical activity. *Journal of Physiology*, 59(1), 243–262.

Malm, C., Sjödin, B., Sjöberg, B., Lenkei, R., Renström, P., Lundberg, I. E., & Ekblom, B. (2004). Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. *Journal of Physiology*, 556(3), 983–1000. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.056598>

Manderson, A. P., Kay, J. G., Hammond, L. A., Brown, D. L., & Stow, J. L. (2007). Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha. *The Journal of Cell Biology*, 178(1), 57–69. <https://doi.org/10.1083/JCB.200612131>

Marks, A. R., Tempst, P., Hwang, K. S., Taubman, M. B., Inui, M., Chadwick, C., ... Nadal-Ginard, B. (1989). Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22), 8683–8687. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.22.8683>

Martin-Cano, F. E., Camello-Almaraz, C., Macías, J. G., Pozo, M. J., & Camello, P. J. (2016). Propagation of Intracellular Ca²⁺ Signals in Aged Exocrine Cells. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 71(2), 145–152. <https://doi.org/10.1093/gerona/glv018>

Matsuda, G. (1983). Las cadenas ligeras de la miosina muscular: su estructura, función y evolución. *Avances En Biofísica*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065227X83900096>

Matta, C., Fodor, J., Csernoch, L., & Zákány, R. (2016). Purinergic signalling-evoked intracellular Ca²⁺ concentration changes in the regulation of chondrogenesis and skeletal muscle formation. *Cell Calcium*, 59(2–3), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.01.006>

- Matthys, P., Mitera, T., Heremans, H., Van Damme, J., & Billiau, A. (1995). Anti-gamma interferon and anti-interleukin-6 antibodies affect staphylococcal enterotoxin B-induced weight loss, hypoglycemia, and cytokine release in D-galactosamine-sensitized and unsensitized mice. *Infection and Immunity*, 63(4), 1158–1164. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1158-1164.1995>
- Mattingly, A. J., Laitano, O., & Clanton, T. L. (2017). Epinephrine stimulates CXCL1 IL-1 α , IL-6 secretion in isolated mouse limb muscle. *Physiological Reports*, 5(23), 1–7. <https://doi.org/10.14814/phy2.13519>
- May, C., Weigl, L., Karel, A., & Hohenegger, M. (2006). Extracellular ATP activates ERK1/ERK2 via a metabotropic P2Y1 receptor in a Ca²⁺ independent manner in differentiated human skeletal muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 71(10), 1497–1509. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.003>
- McCarron, J. G., & Muir, T. C. (1999). Mitochondrial regulation of the cytosolic Ca²⁺ concentration and the InsP₃-sensitive Ca²⁺ store in guinea-pig colonic smooth muscle. *Journal of Physiology*, 516(1), 149–161. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.149aa.x>
- Mckane, W. R., Khosla, S., Peterson, J. M., Egan, K., & Riggs, B. L. (1994). Circulating levels of cytokines that modulate bone resorption: effects of age and menopause in women. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 9(8), 1313–1318. <https://doi.org/10.1002/JBMR.5650090821>
- McKay, B. R., De Lisio, M., Johnston, A. P. W., O'Reilly, C. E., Phillips, S. M., Tarnopolsky, M. A., & Parise, G. (2009). Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006027>
- Megeney, L. A., Perry, R. L. S., Lecouter, J. E., & Rudnicki, M. A. (1996). bFGF and LIF signaling activates STAT3 in proliferating myoblasts. *Developmental Genetics*, 19(2), 139–145. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1996\)19:2<139::AID-DVG5>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1996)19:2<139::AID-DVG5>3.0.CO;2-A)
- Meissner, G., Darling, E., & Eveleth, J. (1986). Kinetics of Rapid Ca²⁺ Release by Sarcoplasmic Reticulum. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and Adenine Nucleotides. *Biochemistry*, 25(1), 236–244. <https://doi.org/10.1021/bi00349a033>
- Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: A view from the lumen. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(1), 10–14. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01143-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01143-2)
- Meldolesi, J., Madeddu, L., & Pozzan, T. (1990). Intracellular Ca²⁺ storage organelles in non-muscle cells: Heterogeneity and functional assignment. *BBA - Molecular Cell Research*, 1055(2), 130–140. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(90\)90113-R](https://doi.org/10.1016/0167-4889(90)90113-R)
- Melzer, W., Rios, E., & Schneider, M. F. (1984). Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal*, 45(3), 637–641. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84203-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84203-4)
- Michalak, M., & MacLennan, D. H. (1980). Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Biosynthesis of the high affinity calcium binding protein in rat skeletal muscle cell cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 255(4), 1327–1334. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)86033-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)86033-7)
- Middleton, P., Rubin, L. L., & Schuetze, S. M. (1988). Desensitization of acetylcholine receptors in rat myotubes is enhanced by agents that elevate intracellular cAMP. *Journal of Neuroscience*, 8(9), 3405–3412. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-09-03405.1988>

Middleton, R. E., & Cohen, J. B. (1991). Mapping of the Acetylcholine Binding Site of the Nicotinic Acetylcholine Receptor: [3H]Nicotine as an Agonist Photoaffinity Label. *Biochemistry*, *30*(28), 6987–6997. <https://doi.org/10.1021/bi00242a026>

Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., ... Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, *340*(6230), 230–233. <https://doi.org/10.1038/340230A0>

Mikyskova, R., Sapega, O., Psocka, M., Novotny, O., Hodny, Z., Balintova, S., ... Reinis, M. (2023). STAT3 inhibitor Stattic and its analogues inhibit STAT3 phosphorylation and modulate cytokine secretion in senescent tumour cells. *Molecular Medicine Reports*, *27*(4), 1–10. <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.12968>

Miljanich, G. P., & Ramachandran, J. (1995). Antagonists Of Channels: Structure, Function, and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *35*, 707–734.

Millay, D. P., O'Rourke, J. R., Sutherland, L. B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature*, *499*(7458), 301–305. <https://doi.org/10.1038/nature12343>

Mishra, S. K., & Hermsmeyer, K. (1994). Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. *Circulation Research*, *75*(1), 144–148. <https://doi.org/10.1161/01.res.75.1.144>

Mizuhara, H., O'Neill, E., Seki, N., Ogawa, T., Kusunoki, C., Otsuka, K., ... Fujiwara, H. (1994). T cell activation-associated hepatic injury: Mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *Journal of Experimental Medicine*, *179*(5), 1529–1537. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1529>

Mohamed, T. M. A., Baudoin-stanley, F. M., Cartwright, E., & Neyses, L. (n.d.). *Chapter 18 Calcium – Calmodulin-Dependent ATPase (PMCA) Activity*. 333–342. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-700-6>

Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., ... Coppack, S. W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *82*(12), 4196–4200. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.12.4450>

Morales, S., Camello, P. J., Alcón, S., Salido, G. M., Mawe, G., & Pozo, M. J. (2004). Coactivation of capacitative calcium entry and L-type calcium channels in guinea pig gallbladder. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *286*(6). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00260.2003>

Morales, S., Camello, P. J., Mawe, G. M., & Pozo, M. J. (2005). Characterization of intracellular Ca²⁺ stores in gallbladder smooth muscle. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *288*(3 51-3), 507–514. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00385.2004>

Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, *12*(1), 1–46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>

Mullins, L. J. (1979). The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *5*(2), 3–10. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1979.236.3.c103>

Muñoz-Cánoves, P., Scheele, C., Pedersen, B. K., & Serrano, A. L. (2013). Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: A double-edged sword? *FEBS Journal*, *280*(17), 4131–4148. <https://doi.org/10.1111/febs.12338>

- Nakai, J., Dirksen, R. T., Nguyen, H. T., Pessah, I. N., Beam, K. G., & Allen, P. D. (1996). Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature*, Vol. 380, pp. 72–75. <https://doi.org/10.1038/380072a0>
- Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2018). The two-faced cytokine IL-6 in host defense and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113528>
- Neubauer, J. (2001). Highlighted Topics. *Journal of Applied Physiology*, 90, 1593–1599. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007556>
- Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., ... Nicola, N. A. (1999). Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO Journal*, 18(2), 375–385. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.375>
- Niggli, E., & Lipp, P. (1993). Subcellular restricted spaces: significance for cell signalling and excitation-contraction coupling. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 14(3), 288–291. <https://doi.org/10.1007/BF00123093>
- Note, P. (1972). *NOTE Separation of Troponin into Its Three Components * The separation of troponin into its components was made as follows . Troponin preparation (5), 30-50mg protein per ml , was sub Uppsala) column chromatography in the presence of 6 M urea as previously described . The fraction eluted by 6 M urea containing 0.1 M NaCl and 2 mM NaHCO3 was diluted with.* 72(3), 787–790.
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., & Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316(6027), 440–443. <https://doi.org/10.1038/316440a0>
- Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V. K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., & MacLennan, D. H. (1998). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12360–12369. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12360>
- Ohtsuki, I., Maruyama, K., & Ebashi, S. (1986). Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. *Advances in Protein Chemistry*, 38(C), 1–67. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60525-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60525-2)
- Okazaki, S., Kawai, H., Arii, Y., Yamaguchi, H., & Saito, S. (1996). Effects of calcitonin gene-related peptide and interleukin 6 on myoblast differentiation. *Cell Proliferation*, 29(4), 173–182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1996.tb00104.x>
- Olguin, H. C., Yang, Z., Tapscott, S. J., & Olwin, B. B. (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *Journal of Cell Biology*, 177(5), 769–779. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608122>
- Olson, E. N., & Williams, R. S. (2000). Remodeling muscles with calcineurin. *BioEssays*, 22(6), 510–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200006\)22:6<510::AID-BIES4>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200006)22:6<510::AID-BIES4>3.0.CO;2-1)
- Ostrowski, K., Hermann, C., Bangash, A., Schjerling, P., Nielsen, J. N., & Pedersen, B. K. (1998). A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *Journal of Physiology*, 513(3), 889–894. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.889ba.x>
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., & Klarlund Pedersen, B. (2001). Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in human. *European Journal of Applied Physiology*, 84(3), 244–245. <https://doi.org/10.1007/s004210170012>
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., & Pedersen, B. K. (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *Journal of Physiology*, 515(1), 287–291. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.287ad.x>

Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S., & Pedersen, B. K. (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *Journal of Physiology*, *508*(3), 949–953. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.949bp.x>

Ottenheijm, C. A. C., & Granzier, H. (2010). Lifting the nebula: Novel insights into skeletal muscle contractility. *Physiology*, *25*(5), 304–310. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2010>

Oudbier, S. J., Goh, J., Maria Looijaard, S. M. L., Reijnierse, E. M., Maria Meskers, C. G., & Maier, A. B. (2022). Pathophysiological Mechanisms Explaining the Association Between Low Skeletal Muscle Mass and Cognitive Function. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *77*(10), 1959–1968. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAC121>

Pacaud, P., & Bolton, T. B. (1991). Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells. *The Journal of Physiology*, *441*(1), 477–499. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018763>

Pan, Z., Brotto, M., & Ma, J. (2014). Store-operated Ca²⁺ entry in muscle physiology and diseases. *BMB Reports*, *47*(2), 69–79. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.2.015>

Pan, Z., Choi, S., & Luo, Y. (2018). Mn²⁺ Quenching Assay for Store-Operated Calcium Entry. *Methods in Molecular Biology*, *1843*, 55–62. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8704-7_4

Pappas, C. T., Bliss, K. T., Zieseniss, A., & Gregorio, C. C. (2011). The Nebulin family: An actin support group. *Trends in Cell Biology*, *21*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.005>

Payne, A. M., Jimenez-Moreno, R., Wang, Z. M., Messi, M. L., & Delbono, O. (2009). Role of Ca²⁺, membrane excitability, and Ca²⁺ stores in failing muscle contraction with aging. *Experimental Gerontology*, *44*(4), 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.09.013>

Peake, J. M., Gatta, P. Della, Suzuki, K., & Nieman, D. C. (2015). Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: Regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise Immunology Review*, *21*(32), 8–25.

Pedersen, B. K. (2011). Muscles and their myokines. *Journal of Experimental Biology*, *214*(2), 337–346. <https://doi.org/10.1242/jeb.048074>

Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological Reviews*, *88*(4), 1379–1406. <https://doi.org/10.1152/physrev.90100.2007>

Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, *8*(8), 457–465. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49>

Pedersen, B. K., & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: Regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews*, *80*(3), 1055–1081. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1055>

Pedersen, B. K., Åkerström, T. C. A., Nielsen, A. R., & Fischer, C. P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology*, *103*(3), 1093–1098. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00080.2007>

Pedersen, B. K., Ostrowski, K., Rohde, T., & Bruunsgaard, H. (1998). The cytokine response to strenuous exercise. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *76*(5), 505–511. <https://doi.org/10.1139/y98-055>

- Pedersen, B. K., Steensberg, A., & Schjerling, P. (2001). Muscle-derived interleukin-6: Possible biological effects. *Journal of Physiology*, 536(2), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0329c.xd>
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., Keller, P., Keller, C., Fischer, C., Hiscock, N., ... Febbraio, M. A. (2003). Muscle-derived interleukin-6: Lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 446(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0981-z>
- Pelegri, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO Journal*, 25(21), 5071–5082. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>
- Pellettieri, J., & Alvarado, A. S. (2007). Cell turnover and adult tissue homeostasis: From humans to planarians. *Annual Review of Genetics*, 41, 83–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130244>
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83(1), 117–161. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00018.2002>
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barclays, J., Williamson, M. P., ... Lee, J. H. (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature*, 391(6670), 896–900. <https://doi.org/10.1038/36110>
- Perez-Reyes, E., Kim, H. S., Lacerda, A. E., Horne, W., Wei, X., Rampe, D., ... Birnbaumer, L. (1989). Induction of calcium currents by the expression of the α 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature*, 340(6230), 233–236. <https://doi.org/10.1038/340233a0>
- Periasamy, M., & Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*, 35(4), 430–442. <https://doi.org/10.1002/mus.20745>
- Peterson, J. M., & Pizza, F. X. (2009). Cytokines derived from cultured skeletal muscle cells after mechanical strain promote neutrophil chemotaxis in vitro. *Journal of Applied Physiology*, 106(1), 130–137. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90584.2008>
- Pette, D., & Staron, R. S. (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 116, 1–76. https://doi.org/10.1007/3540528806_3
- Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50(6), 500–509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)
- Pfannkuche, K. (2015). Cell fusion: Overviews and methods: Second edition. *Cell Fusion: Overviews and Methods: Second Edition*, 1313, 1–248. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2703-6>
- Picard, M., Ritchie, D., Thomas, M. M., Wright, K. J., & Hepple, R. T. (2011). Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell*, 10(6), 1047–1055. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00745.x>
- Picca, A., Calvani, R., Bossola, M., Allocca, E., Menghi, A., Pesce, V., ... Marzetti, E. (2018). Update on mitochondria and muscle aging: All wrong roads lead to sarcopenia. *Biological Chemistry*, 399(5), 421–436. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0331>
- Piessevaux, H., De Winter, B., Louis, E., Muls, V., De Looze, D., Pelckmans, P., ... Tack, J. (2009). Dyspeptic symptoms in the general population: a factor and cluster analysis of symptom groupings. *Neurogastroenterology and Motility*, 21(4), 378–388. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2009.01262.X>

Piessevaux, H., De Winter, B., Louis, E., Muls, V., De Looze, D., Pelckmans, P., ... Tack, J. (2009). Dyspeptic symptoms in the general population: a factor and cluster analysis of symptom groupings. *Neurogastroenterology and Motility*, *21*(4), 378–388. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2009.01262.X>

Pietrangelo, L., D’Incecco, A., Ainbinder, A., Michelucci, A., Kern, H., Dirksen, R. T., ... Protasi, F. (2015). Age-dependent uncoupling of mitochondria from Ca²⁺ release units in skeletal muscle. *Oncotarget*, *6*(34), 35358–35371. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6139>

Pilegaard, H., Ordway, G. A., Saltin, B., & Neufer, P. D. (2000). Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *279*(4 42-4), 806–814. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.4.e806>

Pinton, P., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal*, *17*(18), 5298–5308. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5298>

Platta, H. W., & Stenmark, H. (2011). Endocytosis and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, *23*(4), 393–403. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2011.03.008>

Polster, A., Nelson, B. R., Olson, E. N., & Beam, K. G. (2016). Stac3 has a direct role in skeletal muscle-type excitation-contraction coupling that is disrupted by a myopathy-causing mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(39), 10986–10991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612441113>

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., & Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews*, *74*(3), 595–636. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.595>

Puri, P. L., & Sartorelli, V. (2000). Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *Journal of Cellular Physiology*, *185*(2), 155–173. [https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200011\)185:2<155::AID-JCP1>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200011)185:2<155::AID-JCP1>3.0.CO;2-Z)

Puzianowska-Kuźnicka, M., Owczarz, M., Wieczorowska-Tobis, K., Nadrowski, P., Chudek, J., Slusarczyk, P., ... Mossakowska, M. (2016). Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: the PolSenior study. *Immunity & Ageing : I & A*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/S12979-016-0076-X>

Quinn, M. E., Goh, Q., Kurosaka, M., Gamage, D. G., Petrany, M. J., Prasad, V., & Millay, D. P. (2017). Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nature Communications*, *8*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms15665>

Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., ... Huard, J. (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: Potential for muscle regeneration. *Journal of Cell Biology*, *157*(5), 851–864. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108150>

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, pp. 7420–7426. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7420>

Ralevic, V., reviews, G. B.-P., & 1998, undefined. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *ASPETV Ralevic, G BurnstockPharmacological Reviews*, 1998•ASPET. Retrieved from <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/50/3/413.short>

- Rao, A., Luo, C., & Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annual Review of Immunology*, *15*, 707–747. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.707>
- Rao, R. R., Long, J. Z., White, J. P., Svensson, K. J., Lou, J., Lokurkar, I., ... Spiegelman, B. M. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*, *157*(6), 1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.065>
- Raschke, S., Eckardt, K., Bjørklund Holven, K., Jensen, J., & Eckel, J. (2013). Identification and Validation of Novel Contraction-Regulated Myokines Released from Primary Human Skeletal Muscle Cells. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062008>
- Rebeck, R. T., Karunasekara, Y., Board, P. G., Beard, N. A., Casarotto, M. G., & Dulhunty, A. F. (2014). Skeletal muscle excitation-contraction coupling: Who are the dancing partners? *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *48*(1), 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.12.001>
- Reggiani, C., & Kronnie, T. Te. (2006). RyR isoforms and fibre type-specific expression of proteins controlling intracellular calcium concentration in skeletal muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *27*(5–7), 327–335. <https://doi.org/10.1007/s10974-006-9076-3>
- Reuter, H. (1983). Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature*, *301*(5901), 569–574. <https://doi.org/10.1038/301569a0>
- Rios, E., & Pizarro, G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological Reviews*, *71*(3), 849–908. <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.3.849>
- Rivero, J. L. L., Talmadge, R. J., & Edgerton, V. R. (1998). Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *19*(7), 733–742. <https://doi.org/10.1023/A:1005482816442>
- Romanick, M., Thompson, L. D. V., & Brown-Borg, H. M. (2013). Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1832*(9), 1410–1420. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2013.03.011>
- Rome, L. C. (2006). Design and function of superfast muscles: New insights into the physiology of skeletal muscle. *Annual Review of Physiology*, *68*, 193–221. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.105418>
- Romijn, J. A., Coyle, E. F., Sidossis, L. S., Gastaldelli, A., Horowitz, J. F., Endert, E., & Wolfe, R. R. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *265*(3 28-3), 380–391. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.265.3.e380>
- Rosado, J. A., Brownlow, S. L., & Sage, S. O. (2002). Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca²⁺ entry by conformational coupling in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(44), 42157–42163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207320200>
- Rose-john, S., Elson, G., & Jones, S. A. (2006). Bread baking. *J. Leukoc. Biol.*, *80*(August), 227–236. <https://doi.org/10.1189/jlb.1105674.1>
- Rousseau, E., Smith, J. S., & Meissner, G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca²⁺ release channel. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *253*(3), 364–368. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.253.3.c364>

Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N. J., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., & Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 75(7), 1351–1359. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90621-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90621-V)

S. Hikida, R. (2011). Aging changes in satellite cells and their functions. *Current Aging Science*, 4(3), 279–297. <https://doi.org/10.2174/1874609811104030279>

Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Scale, P., Asakura, A., & Rudnicki, M. A. (1999). Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, 144(4), 631–643. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.631>

Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T., & Kishimoto, T. (1992). Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *The Journal of Immunology*, 148(12), 4066–4071. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.148.12.4066>

Samavati, L., Rastogi, R., Du, W., Hüttemann, M., Fite, A., & Franchi, L. (2009). STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. *Molecular Immunology*, 46(8–9), 1867–1877. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.02.018>

Sanchez, B. Y. J. A., Stefani, E., N, C. D. I. I. P., & Postal, A. (1978). *FIBRES OF THE FROG From the Department of Physiology and Biophysics*, . 197–209.

Sanchez-Collado, J., Lopez, J. J., Jardin, I., Berna-Erro, A., Camello, P. J., Cantonero, C., ... Rosado, J. A. (2022). Orai1 α , but not Orai1 β , co-localizes with TRPC1 and is required for its plasma membrane location and activation in HeLa cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04098-w>

Sanders, K. M. (2001). Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(3), 1438–1449. <https://doi.org/10.1152/JAPPL.2001.91.3.1438>

Sandow, A. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 25(3), 176–201.

Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I., & Yoshimura, A. (2000). CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29338–29347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003456200>

Satrústegui, J., Villalba, M., Pereira, R., Bogónez, E., & Martínez-Serrano, A. (1996). Cytosolic and mitochondrial calcium in synaptosomes during aging. *Life Sciences*, 59(5–6), 429–434. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00322-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00322-0)

Schaller, M. D. (2010). Cellular functions of FAK kinases: Insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of Cell Science*, 123(7), 1007–1013. <https://doi.org/10.1242/jcs.045112>

Scheler, M., Irmeler, M., Lehr, S., Hartwig, S., Staiger, H., Al-Hasani, H., ... Weigert, C. (2013). Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 305(8), 877–886. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00043.2013>

Schiaffino, S., & Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews*, 76(2), 371–423. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.2.371>

Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2019>
- Schmalbruch, H., & Lewis, D. M. (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle and Nerve*, *23*(4), 617–626. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(200004\)23:4<617::AID-MUS22>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(200004)23:4<617::AID-MUS22>3.0.CO;2-Y)
- Schmidt, M., Schüler, S. C., Hüttner, S. S., von Eyss, B., & von Maltzahn, J. (2019). Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *76*(13), 2559–2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6>
- Schneider, M. F. (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annual Review of Physiology*, *56*, 463–484. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PH.56.030194.002335>
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, *102*(6), 777–786. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00066-0)
- Selinger, Z., Doza, Y. N., & Minke, B. (1993). Mechanisms and genetics of photoreceptors desensitization in Drosophila flies. *BBA - Molecular Cell Research*, *1179*(3), 283–299. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(93\)90084-3](https://doi.org/10.1016/0167-4889(93)90084-3)
- Serysheva, I. I., Hamilton, S. L., Chiu, W., & Ludtke, S. J. (2005). Structure of Ca²⁺ release channel at 14 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *345*(3), 427–431. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2004.10.073>
- Severinsen, M. C. K., & Pedersen, B. K. (2020). Muscle-Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocrine Reviews*, *41*(4), 594–609. <https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAA016>
- Shah, M., Patel, K., Mukhopadhyay, S., Xu, F., Guo, G., & Sehgal, P. B. (2006). Membrane-associated STAT3 and PY-STAT3 in the cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(11), 7302–7308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508527200>
- Sheehan, S. M., & Allen, R. E. (1999). Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *Journal of Cellular Physiology*, *181*(3), 499–506. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199912\)181:3499::AID-JCP13.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199912)181:3499::AID-JCP13.0.CO;2-1)
- Shi, X., & Garry, D. J. (2006). Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes and Development*, *20*(13), 1692–1708. <https://doi.org/10.1101/gad.1419406>
- Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., & Tajbakhsh, S. (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nature Cell Biology*, *8*(7), 677–682. <https://doi.org/10.1038/ncb1425>
- Shull, G. E. (2000). Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases. *European Journal of Biochemistry*, *267*(17), 5284–5290. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01568.x>
- Simmerman, H. K. B., Kobayashi, Y. M., Autry, J. M., & Jones, L. R. (1996). A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(10), 5941–5946. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5941>
- Smith, I. C., Bombardier, E., Vigna, C., & Tupling, A. R. (2013). ATP Consumption by Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Pumps Accounts for 40-50% of Resting Metabolic Rate in Mouse Fast and Slow Twitch Skeletal Muscle. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068924>

Smith, J. S., Coronado, R., & Meissner, G. (1986). Activation by Ca²⁺ and ATP and Modulation by Mg²⁺. *The Journal of General Physiology*, 88(November), 573–588.

Smith, J. S., Imagawa, T., Ma, J., Fill, M., Campbell, K. P., & Coronado, R. (1988). Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of General Physiology*, 92(1), 1–26. <https://doi.org/10.1085/jgp.92.1.1>

Snutch, T. P., Tomlinson, W. J., Leonard, J. P., & Gilbert, M. M. (1991). Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron*, 7(1), 45–57. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90073-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90073-9)

Somlyo, A., & Somlyo, A. (1968). Acoplamiento electromecánico y farmacomecánico en músculo liso vascular. *Revista de Farmacología y Experimentación*. Retrieved from <https://jpet.aspetjournals.org/content/159/1/129.short>

Sorrentino, V., & Rizzuto, R. (2001). 11543873. 22(9), 459–464.

Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubrea, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., ... Muñoz-Cánoves, P. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*, 506(7488), 316–321. <https://doi.org/10.1038/nature13013>

Spread, I., Activation, O. F., & Gonzalez-serratos, B. Y. H. (1971). *College London*,. 777–799.

Stanfield, P. R. (1977). A calcium dependent inward current in frog skeletal muscle fibres. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 368(3), 267–270. <https://doi.org/10.1007/BF00585206>

Steensberg, A., Febbraio, M. A., Osada, T., Schjerling, P., Van Hall, G., Saltin, B., & Pedersen, B. K. (2001). Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *Journal of Physiology*, 537(2), 633–639. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00633.x>

Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Osada, T., Febbraio, M. A., & Pedersen, B. K. (2002). IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 283(6 46-6), 1272–1278. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00255.2002>

Steensberg, A., Toft, A. D., Schjerling, P., Halkjær-Kristensen, J., & Pedersen, B. K. (2001). Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: Role of epinephrine. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 281(3 50-3), 1001–1004. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.3.c1001>

Steinbach, J. H. (1989). Structural and functional diversity in vertebrate skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Annual Review of Physiology*, 51, 353–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.51.1.353>

Steinbach, J., neurociencias, J. Z.-T. en, & 1987, undefined. (n.d.). ¿Qué hace la fosforilación para el receptor nicotínico de acetilcolina? *Elsevier*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166223687900245>

Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z., Wang, S., Burch, J., Graham, V., ... Rosenberg, P. (2009). *for Development and Contractile Function in Skeletal Muscle*. 10(6), 688–697. <https://doi.org/10.1038/ncb1731.STIM1>

Straight, C. R., Ades, P. A., Toth, M. J., & Miller, M. S. (2018). Age-related reduction in single muscle fiber calcium sensitivity is associated with decreased muscle power in men and women. *Experimental Gerontology*, 102, 84–92. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2017.12.007>

- Strehler, E. E., & Zacharias, D. A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiological Reviews*, *81*(1), 21–50. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.21>
- Striessnig, J. (2007). C-terminal tailoring of L-type calcium channel function. *Journal of Physiology*, *585*(3), 643–644. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.147140>
- Sunagawa, M. (2010). Involvement of Ca²⁺ channel activity in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Pathophysiology*, *17*(2), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2009.03.010>
- Surprenant, A., & Alan North, R. (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual Review of Physiology*, *71*, 333–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>
- Suzuki, H. (1985). Electrical responses of smooth muscle cells of the rabbit ear artery to adenosine triphosphate. *The Journal of Physiology*, *359*(1), 401–415. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015592>
- Swartz, D. R., Yang, Z., Sen, A., Tikunova, S. B., & Davis, J. P. (2006). Myofibrillar troponin exists in three states and there is signal transduction along skeletal myofibrillar thin filaments. *Journal of Molecular Biology*, *361*(3), 420–435. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.05.078>
- Sztretye, M., Geyer, N., Vincze, J., Al-Gaadi, D., Oláh, T., Szentesi, P., ... Dienes, B. (2017). SOCE Is Important for Maintaining Sarcoplasmic Calcium Content and Release in Skeletal Muscle Fibers. *Biophysical Journal*, *113*(11), 2496–2507. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.023>
- Tada, M., & Kadoma, M. (1989). Regulation of the Ca²⁺ pump atpase by cAMP-dependent phosphorylation of phospholamban. *BioEssays*, *10*(5), 157–163. <https://doi.org/10.1002/bies.950100505>
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., ... Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, *58*(3), 573–581. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90438-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90438-8)
- Tajbakhsh, S. (2009). Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *Journal of Internal Medicine*, *266*(4), 372–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02158.x>
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., & Buckingham, M. (1996). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature*, *384*(6606), 266–270. <https://doi.org/10.1038/384266A0>
- Takaesu, G., Kang, J. S., Bae, G. U., Yi, M. J., Lee, C. M., Premkumar Reddy, E., & Krauss, R. S. (2006). Activation of p38 α/β MAPK in myogenesis via binding of the scaffold protein JLP to the cell surface protein Cdo. *Journal of Cell Biology*, *175*(3), 383–388. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608031>
- Tanabe, T., Beam, K. G., Powell, J. A., & Numa, S. (1988). Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature*, *336*(6195), 134–139. <https://doi.org/10.1038/336134A0>
- Tannu, N. S., Rao, V. K., Chaudhary, R. M., Giorgianni, F., Saeed, A. E., Gao, Y., & Raghov, R. (2004). Comparative proteomes of the proliferating C(2)C(12) myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *3*(11), 1065–1082. <https://doi.org/10.1074/MCP.M400020-MCP200>
- Tarum, J., Folkesson, M., Atherton, P. J., & Kadi, F. (2017). Electrical pulse stimulation: an in vitro exercise model for the induction of human skeletal muscle cell hypertrophy. A

proof-of-concept study. *Experimental Physiology*, 102(11), 1405–1413. <https://doi.org/10.1113/EP086581>

Tavi, P., & Westerblad, H. (2011). The role of in vivo Ca²⁺ signals acting on Ca²⁺-calmodulin-dependent proteins for skeletal muscle plasticity. *Journal of Physiology*, 589(21), 5021–5031. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212860>

Teixeira, V. de O. N., Filippin, L. I., & Xavier, R. M. (2012). Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 52(2), 247–253.

Thomas, G. D. (2013). Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Frontiers in Physiology*, 4 DEC(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00381>

Thrower, E. C., Hagar, R. E., & Ehrlich, B. E. (2001). Regulation of Ins(1,4,5)P₃ receptor isoforms by endogenous modulators. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 580–586. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01809-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01809-5)

Tidball, J. G., & Villalta, S. A. (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 298(5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00735.2009>

Tilg, H., Dinarello, C. A., & Mier, J. W. (1997). IL-6 and APPs: Anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology Today*, 18(9), 428–432. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01103-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01103-1)

Toescu, E. C., & Verkhatsky, A. (2007). The importance of being subtle: Small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging. *Aging Cell*, 6(3), 267–273. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00296.x>

Toth, K. G., McKay, B. R., de Lisio, M., Little, J. P., Tarnopolsky, M. A., & Parise, G. (2011). IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017392>

Toyofuku, T., Kurzydowski, K., Lytton, J., & MacLennan, D. H. (1992). The nucleotide binding/hinge domain plays a crucial role in determining isoform-specific Ca²⁺ dependence of organellar Ca²⁺-ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 14490–14496. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)49739-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)49739-1)

Treves, S., Vukcevic, M., Jeannet, P. Y., Levano, S., Girard, T., Urwyler, A., ... Zorzato, F. (2011). Enhanced excitation-coupled Ca²⁺ entry induces nuclear translocation of NFAT and contributes to IL-6 release from myotubes from patients with central core disease. *Human Molecular Genetics*, 20(3), 589–600. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq506>

Tsien, R. W., Hess, P., McCleskey, E. W., & Rosenberg, R. L. (1987). Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 16, 265–290. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BB.16.060187.001405>

Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D., Bley, K., & Fox, A. (1995). Reflections on Ca²⁺-channel diversity, 1988-1994. *Trends in Neurosciences*, 18(2), 52–54. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)80015-T](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)80015-T)

Tsigos, C., Kyrou, I., Chala, E., Tsapogas, P., Stavridis, J. C., Raptis, S. A., & Katsilambros, N. (1999). Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 48(10), 1332–1335. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(99\)90277-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(99)90277-9)

Tu, M. K., Levin, J. B., Hamilton, A. M., & Borodinsky, L. N. (2016). Calcium signaling in skeletal muscle development, maintenance and regeneration. *Cell Calcium*, 59(2–3), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.005>

- Tuyt, L. M. L., Dokter, W. H. A., Birkenkamp, K., Koopmans, S. B., Lummen, C., Kruijer, W., & Vellenga, E. (1999). Extracellular-Regulated Kinase 1/2, Jun N-Terminal Kinase, and c-Jun Are Involved in NF- κ B-Dependent IL-6 Expression in Human Monocytes. *The Journal of Immunology*, *162*(8), 4893–4902. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.8.4893>
- Unwin, N. (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *229*(4), 1101–1124. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1107>
- Valentim, M. A., Brahmabhatt, A. N., & Tupling, A. R. (2022). Skeletal and cardiac muscle calcium transport regulation in health and disease. *Bioscience Reports*, *42*(12), 1–20. <https://doi.org/10.1042/BSR20211997>
- Van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., ... Wuytack, F. (2004). The Ca²⁺/Mn²⁺ pumps in the Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1742*(1–3), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.08.018>
- Van Densen, W. L. T., & Vijverberg, J. (1982). The relations between 0+ fish density, zooplankton size and the vulnerability of pikeperch, *Stizostedion lucioperca*, to angling in the Frisian lakes. *Hydrobiologia*, *95*(1), 321–336. <https://doi.org/10.1007/BF00044493>
- Verboogen, D. R. J., Revelo, N. H., Ter Beest, M., & Van Den Bogaart, G. (2019). Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes. *Journal of Molecular Cell Biology*, *11*(2), 144–157. <https://doi.org/10.1093/JMCM/MJY038>
- Verboogen, D. R. J., ter Beest, M., Honigmann, A., & van den Bogaart, G. (2018). Secretory vesicles of immune cells contain only a limited number of interleukin 6 molecules. *FEBS Letters*, *592*(9), 1535–1544. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13036>
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., ... Penner, R. (2017). *Channel*. *16*(20), 2073–2079. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.085.CRACM1>
- Vollert, C. S., & Uetz, P. (2004). The phox homology (PX) domain protein interaction network in yeast. *Molecular and Cellular Proteomics*, *3*(11), 1053–1064. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400081-MCP200>
- Wagenknecht, T. (2002). Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Frontiers in Bioscience*, *7*(1–3), d1464. <https://doi.org/10.2741/wagen>
- Wagers, A. J., & Conboy, I. M. (2005). Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: Current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell*, *122*(5), 659–667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.021>
- Wakelam, M. J. (1985). The fusion of myoblasts. *The Biochemical Journal*, *228*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1042/bj2280001>
- Walker, D., & De Waard, M. (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: Role in channel function. *Trends in Neurosciences*, *21*(4), 148–154. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01200-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01200-9)
- Walston, J. D. (2012). Sarcopenia in older adults. *Current Opinion in Rheumatology*, *24*(6), 623–627. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328358d59b>
- Wan, L., Wu, W., Jiang, S., Wan, S., Meng, D., Wang, Z., ... Yu, P. (2020). Mibefradil and Flunarizine, Two T-Type Calcium Channel Inhibitors, Protect Mice against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. *Mediators of Inflammation*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/3691701>
- Wang, J., Ambrosi, C., Qiu, F., Jackson, D. G., Sosinsky, G., & Dahl, G. (2014). The membrane protein Pannexin1 forms two open-channel conformations depending on the mode of activation. *Science Signaling*, *7*(335), 1–9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005431>

Wang, K., & Klionsky, D. J. (2011). Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy*, 7(3), 297–300. <https://doi.org/10.4161/auto.7.3.14502>

Wang, K., & Wright, J. (1988). Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: Immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z line. *Journal of Cell Biology*, 107(6 1), 2199–2212. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.6.2199>

Wang, K., Wang, C., Xiao, F., Wang, H., & Wu, Z. (2008). JAK2/STAT2/STAT3 are required for myogenic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34029–34036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803012200>

Wang, L., Karlsson, L., Moses, S., Hultgårdh-Nilsson, A., Andersson, M., Borna, C., ... Erlinge, D. (2002). P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 40(6), 841–853. <https://doi.org/10.1097/00005344-200212000-00005>

Wang, Z. M., Messi, M. L., & Delbono, O. (2000). L-type Ca²⁺ channel charge movement and intracellular Ca²⁺ in skeletal muscle fibers from aging mice. *Biophysical Journal*, 78(4), 1947–1954. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76742-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76742-7)

Weaver, E. M., Zamora, F. J., Hearne, J. L., & Martin-Caraballo, M. (2015). Posttranscriptional regulation of T-type Ca²⁺ channel expression by interleukin-6 in prostate cancer cells. *Cytokine*, 76(2), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.004>

Wei, J., Xu, H., Davies, J. L., & Hemmings, G. P. (1992). Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sciences*, 51(25), 1953–1956. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90112-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90112-3)

Weigert, C., Düfer, M., Simon, P., Debre, E., Runge, H., Brodbeck, K., ... Schleicher, E. D. (2007). Upregulation of IL-6 mRNA by IL-6 in skeletal muscle cells: Role of IL-6 mRNA stabilization and Ca²⁺-dependent mechanisms. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 293(3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00142.2007>

Weigl, L., Zidar, A., Gscheidlinger, R., Karel, A., & Hohenegger, M. (2003). Store operated Ca²⁺ influx by selective depletion of ryanodine sensitive Ca²⁺ pools in primary human skeletal muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 367(4), 353–363. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0705-8>

Weilinger, N. L., Tang, P. L., & Thompson, R. J. (2012). Anoxia-induced NMDA receptor activation opens Pannexin channels via Src family kinases. *Journal of Neuroscience*, 32(36), 12579–12588. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1267-12.2012>

Weintraub, H., Dwarki, V. J., Verma, I., Davis, R., Hollenberg, S., Snider, L., ... Tapscott, S. J. (1991). Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes and Development*, 5(8), 1377–1386. <https://doi.org/10.1101/gad.5.8.1377>

Weisleder, N., Brotto, M., Komazaki, S., Pan, Z., Zhao, X., Nosek, T., ... Ma, J. (2006). Muscle aging is associated with compromised Ca²⁺ spark signaling and segregated intracellular Ca²⁺ release. *The Journal of Cell Biology*, 174(5), 639–645. <https://doi.org/10.1083/JCB.200604166>

Welc, S. S., Phillips, N. A., Oca-Cossio, J., Wallet, S. M., Chen, D. L., & Clanton, T. L. (2012). Hyperthermia increases interleukin-6 in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 303(4), 3–4. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00028.2012>

Whitham, M., Chan, M. H. S., Pal, M., Matthews, V. B., Prelovsek, O., Lunke, S., ... Febbraio, M. A. (2012). Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 10771–10779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310581>

Williams, D. E. (2018). Letter to the Editor. *Toxicological Sciences*, 164(1), 3–4. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy095>

Williams, R. S., & Rosenberg, P. (2002). Calcium-dependent gene regulation in myocyte hypertrophy and remodeling. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 67, 339–344. <https://doi.org/10.1101/SQB.2002.67.339>

Williamson, D., Gallagher, P., Harber, M., Hollon, C., & Trappe, S. (2003). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: Effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 547(3), 977–987. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.036673>

Willkomm, L., & Bloch, W. (2015). State of the art in cell-cell fusion. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1313, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2703-6_1

Wilson, J. W. (1978). The position of regenerating cambia: auxin/sucrose ratio and the gradient induction hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 203(1151), 153–170. <https://doi.org/10.1098/rspb.1978.0098>

Wolfe, R. R. (2018). *The underappreciated role of muscle in health and disease 1 X 3*. (February), 475–482.

Wozniak, A. C., & Anderson, J. E. (2007). Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Developmental Dynamics*, 236(1), 240–250. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21012>

Xu, H., & Van Remmen, H. (2021). The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: a potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. *Skeletal Muscle*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00280-7>

Yasukawa, H., Sasaki, A., & Yoshimura, A. (2000). N Egateive R Egulation of C Ytokine. *Annual Review of Immunology*, 2, 143–164.

Yin, H., Price, F., & Rudnicki, M. A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews*, 93(1), 23–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>

Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., ... Yanagi, S. (2009). Mutant SOD1 and Attenuates Mutant SOD1-induced Reactive Oxygen Species Generation. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 4524–4530. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>

Yoshimura, A. (1998). The CIS family: Negative regulators of JAK-STAT signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 9(3–4), 197–204. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(98\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(98)00019-7)

Young, H. E., Duplax, C., Young, T. M., Floyd, J. A., Reeves, M. L., Davis, K. H., ... Black, A. C. (2001). Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anatomical Record*, 263(4), 350–360. <https://doi.org/10.1002/ar.1112>

Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal? *Journal of Cell Biology*, 166(3), 347–357. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312007>

Zammit, P. S., Partridge, T. A., & Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(11), 1177–1191. <https://doi.org/10.1369/jhc.6R6995.2006>

Zhang, B. X., & Muallem, S. (1992). Feedback inhibition of Ca²⁺ release by Ca²⁺ is the underlying mechanism of agonist-evoked intracellular Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267(34), 24387–24393. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)35778-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)35778-8)

Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M., & Jones, L. R. (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor: Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 272(37), 23389–23397. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23389>

Zhang, Q., Vashisht, A. A., O'Rourke, J., Corbel, S. Y., Moran, R., Romero, A., ... Sampath, S. C. (2017). The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15664>

Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Mark, H., ... Cahalan, M. D. (2006). 2006_Zhang et al._October. 437(7060), 902–905.

Zhang, X., Xin, P., Yoast, R. E., Emrich, S. M., Johnson, M. T., Pathak, T., ... Trebak, M. (2020). Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels. *Cell Calcium*, 91(August), 102281. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102281>

Zhou, J., Yi, J., Royer, L., Launikonis, B. S., González, A., García, J., & Ríos, E. (2006). A probable role of dihydropyridine receptors in repression of Ca²⁺ sparks demonstrated in cultured mammalian muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 290(2), 539–553. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00592.2004>

Zhu, H., Xiao, F., Wang, G., Wei, X., Jiang, L., Chen, Y., ... Wu, Z. (2016). STAT3 Regulates Self-Renewal of Adult Muscle Satellite Cells during Injury-Induced Muscle Regeneration. *Cell Reports*, 16(8), 2102–2115. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.041>

Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., & Birnbaumer, L. (1996). trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell*, 85(5), 661–671. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81233-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81233-7)

Zimányi, I., Buck, E., Abramson, J., ... M. M.-M., & 1992, undefined. (n.d.). Ryanodine induces persistent inactivation of the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *ASPETI Zimányi, E Buck, JJ Abramson, MM Mack, IN PessahMolecular Pharmacology, 1992•ASPET.* Retrieved from <https://molpharm.aspetjournals.org/content/42/6/1049.short>