



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Faculta de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

**Estudio de la expresión y localización subcelular del  
transportador de vitamina C (SVCT2) en fenómenos de plasticidad  
del músculo esquelético**

DANIEL ANDRÉS SANDOVAL SILVA

CONCEPCIÓN-CHILE

2011

Profesor Tutor: Juan Pablo Henríquez Hohmann  
Francisco Nualart Santander  
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

**Dr. Juan Pablo Henríquez H.**  
Profesor Tutor  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

**Dr. Francisco Nualart S.**  
Profesor Tutor  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

**Dr. Carlos Opazo M.**  
Profesor Evaluador interno  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

**Dra. María de los Angeles García R.**  
Profesor Evaluador interno  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

**Dr. Juan Reyes**  
Profesor Evaluador Externo  
Pontificia Universidad Católica  
de Valparaíso

---

**Dr. José Guzmán González**  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias  
Biológicas, Área Biología Celular y  
Molecular



Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto Anillo en Ciencia y Tecnología ACT-02 (2007-2009).

Proyecto FONDECYT 1100326 (2010-2012).

Beca Escuela de Graduados Universidad de Concepción (2006-2008)

Beca CONICYT para estudios de doctorado (2008-2010).

Beca CONICYT para Apoyo de realización de Tesis Doctoral (2010)

CONICYT, Proyecto Anillo ACT-02 y Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción para presentaciones en reuniones científicas nacionales (2006-2011).

Centro de Microscopía Avanzada. Universidad de Concepción.



A ***Leticia y Daniel***

A mis ***Padres y Hermanos***

## Agradecimientos

Al concluir este largo proceso de aprendizaje tanto en lo formal como en lo extra académico, preciso en estas líneas agradecer a todas las personas que colaboraron directa e indirectamente en que este momento llegara.

En primer lugar quiero profundamente agradecer a mi Tutor de Tesis el Dr. Juan Pablo Henríquez por permitirme ingresar a su recién nacido laboratorio y dejarme aportar con mi experiencia en campos necesarios para el desarrollo de nuestra investigación. Muchas gracias por el apoyo personal y por tus enseñanzas. Sin duda, más que mi Tutor eres un gran amigo.

Por otra parte, agradezco particularmente al Dr. Francisco Nualart, en primer lugar por abrirme las puertas de su laboratorio cuando recién llegué al programa. Gracias por todo el apoyo personal y por su formación hacia el conocimiento.

A todos mis compañeros del laboratorio de Neurobiología del Desarrollo. A Marcela, por toda la colaboración en los momentos más difíciles de mi tesis y por su apoyo en la discusión de los resultados obtenidos. A Evelyn, por su trabajo, simpatía y colaboración. A los nuevos integrantes del laboratorio, Cristina, Jaime y particularmente Jorge, porque gracias a ustedes pudimos generar un ambiente de simpatía y cordialidad entre nuestros experimentos.

A nuestra Sra. Aída, por su gran preocupación y trabajo que hace nuestra labor sea más fácil todos los días.

A mis compañeros y amigos del laboratorio del final del pasillo, Pedro, Federico, Feña, Andrea, Katty, Vivi, Cristian y Ximena muchas gracias por su compañía y amistad.

A los demás miembros del Departamento de Biología celular, Dra. María de los Ángeles, Dr. Sylvain Marcellini, Dr. Hernán Montecino y Dra. Teresa Caprile, Dra. Karin Reinecke por su formación, apoyo y compañía durante estos años.

Especialmente quiero agradecer a mi familia. A mis Padres, quienes a pesar de la distancia me han entregado todo su apoyo durante toda mi vida. Gracias por haberme inculcado el compromiso, el trabajo y la paciencia como

pilares fundamentales de mi vida. A mis hermanos, por su apoyo, colaboración e interés en mi formación.

Finalmente te agradezco Leticia por la compañía, la paciencia y tu gran amor. Gracias por acompañarme y hacerme sentir protegido en tus brazos durante los momentos más complicados. A Daniel, por que tus ojos me recuerdan en cada momento que eres parte de mi corazón, gracias por esperarme en las noches para verme llegar a casa.



## I. ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>Índice General</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>X</b>
<b>Índice de Anexos</b>	<b>XVI</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>XVII</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>XVIII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XXI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XXIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. Músculo esquelético</b>	<b>2</b>
1.1. Miogénesis	2
1.2. Estructura del músculo esquelético	3
1.2.1. Criterios de clasificación de las fibras musculares esqueléticas	5
1.2.2. Músculo esquelético en aves	6
1.3. Definición del fenotipo de las fibras musculares	7
<b>2. Plasticidad muscular</b>	<b>9</b>



2.1. Rol del calcio en la plasticidad muscular	10
<b>3. Especies oxidativas en el músculo esquelético</b>	<b>12</b>
3.1. Especies oxidativas y estrés oxidativo	12
3.2. Mecanismos antioxidantes en el músculo esquelético	13
<b>4. Vitamina C</b>	<b>14</b>
4.1. Vitamina C y su rol como agente antioxidante en el músculo esquelético	15
<b>5. Sistemas transportadores de vitamina C</b>	<b>16</b>
5.1. Transporte de DHA mediado por GLUTs en el músculo esquelético	17
5.2. Transporte de AA mediado por los co-transportadores de sodio y vitamina C (SVCTs) en el músculo esquelético	17
5.2.1. Características generales	17
5.2.2. Regulación de los transportadores SVCTs	19
5.3. SVCTs en el músculo esquelético	19



<b>II.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>21</b>
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>23</b>
	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>23</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
	<b>1. Materiales</b>	<b>24</b>
1.1.	Animales de experimentación	24
1.2.	Cultivo celular	24
1.3.	Soluciones de cultivo celular	24
1.4.	Soluciones de fraccionamiento subcelular de membranas musculares	25
1.5.	Enzimas	26
1.6.	Reactivos y soluciones ultrapuras	26
1.7.	Oligonucléotidos	26
1.8.	Anticuerpos	27
1.9.	Kit comerciales	29

1.10. Reactivos y soluciones en general	29
1.11. Materiales en general	30
<b>2. Métodos</b>	<b>30</b>
<b>2.1. Animales de experimentación</b>	<b>30</b>
<b>2.2. Cultivos celulares</b>	<b>31</b>
2.2.1. Mantenimiento de los cultivos celulares	31
2.2.2. Cultivos primarios de mioblastos de pollo	31
2.2.3. Extracto de embrión de pollo	32
2.2.4. Cultivos primarios de miotubos de ratón	32
2.2.5. Aislamiento de fibras musculares esqueléticas de ratón adulto	33
<b>2.3. Estimulación eléctrica</b>	<b>33</b>
2.3.1. Estimulación eléctrica en miotubos de ratón	33
2.3.2. Estimulación eléctrica de fibras aisladas	34
<b>2.4. RT-PCR</b>	<b>34</b>

2.4.1. Extracción de ARN total	34
2.4.2. Reacción de transcripción reversa	35
2.4.3. PCR utilizando KAPA <i>Taq</i> polimerasa	35
<b>2.5. PCR tiempo real (qPCR)</b>	<b>36</b>
2.5.1. Cuantificación por PCR en tiempo real	36
<b>2.6. Extractos de proteínas musculares</b>	<b>36</b>
2.6.1. Extractos de proteínas totales	36
2.6.2. Obtención de extractos enriquecidos en proteínas citosólicas y de membrana	37
<b>2.7. Cuantificación de proteínas</b>	<b>37</b>
<b>2.8. Western blot</b>	<b>38</b>
2.8.1. Electroforesis de proteínas	38
2.8.2. Transferencia a membrana PVDF Immobilon	38
2.8.3. Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado	38
2.8.4. Cuantificación de la intensidad de bandas	39
<b>2.9. Inmunohistoquímica</b>	<b>39</b>

<b>2.10. Inmunocitoquímica</b>	<b>40</b>
<b>2.11. Histoquímica</b>	<b>40</b>
2.11.1. ATPasa miofibrilar (mATPasa)	41
2.11.2. NADH-TR	41
<b>2.12. Determinación del área de sección transversal (CSA) de las fibras musculares</b>	<b>41</b>
<b>2.13. Tratamiento de cubreobjetos con HCl</b>	<b>41</b>
<b>2.14. Adquisición de imágenes</b>	<b>42</b>
<b>2.15. Fraccionamiento de músculo esquelético de pollo adulto</b>	<b>42</b>
2.15.1. Fraccionamiento fuerza iónica-detergente	42
2.15.2. Fraccionamiento detergente-fuerza iónica	42
<b>2.16. Estadística</b>	<b>44</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>1. Expresión de SVCT2 en músculo esquelético de pollo adulto</b>	<b>46</b>

1.1.	Distribución de SVCT2 en el músculo esquelético de pollo adulto	47
1.2.	Caracterización de las fibras musculares esqueléticas de pollo durante la etapa post-natal	50
1.2.1.	Caracterización morfológica y metabólica de fibras musculares de pollo	50
1.2.2.	Caracterización molecular de las fibras musculares de pollo	52
<b>1.3.</b>	<b>Expresión de SVCT2 en músculos esqueléticos de pollo</b>	<b>56</b>
1.3.1.	Comportamiento temporal de la expresión de SVCT2 en músculos lentos y rápidos de pollo post-natal	56
1.3.2.	Distribución de SVCT2 en el músculo esquelético de pollo	59
<b>1.4.</b>	<b>Distribución intracelular de SVCT2 en fibras musculares lentas oxidativas</b>	<b>63</b>
<b>2.</b>	<b>Patrón de distribución intracelular del co-transportador sodio ascorbato SVCT2 en fibras musculares lentas oxidativas</b>	<b>67</b>
2.1.	Localización subcelular de SVCT2 en fibras musculares lentas oxidativas	67
2.2.	Localización subcelular de SVCT2 en miotubos de pollo	84

<b>3. Regulación de la expresión de SVCT2 en fibras aisladas y miotubos de ratón</b>	<b>86</b>
3.1. La depolarización de membrana inducida por electroestimulación aumenta la expresión de SVCT2 en fibras aisladas y miotubos de ratón	88
3.2. La depolarización de membrana inducida por electroestimulación altera la distribución de SVCT2 en fibras aisladas de ratón	90
<b>VI. ANEXOS</b>	<b>95</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>98</b>
<b>1. SVCT2 se expresa en músculos lentos de pollo adulto</b>	<b>98</b>
<b>2. SVCT2 se expresa en el músculo esquelético durante el desarrollo post-natal temprano en pollos</b>	<b>102</b>
<b>3. SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo</b>	<b>105</b>
<b>4. SVCT2 se localiza en dominios internos de membrana en fibras musculares lentas oxidativas de pollo y humano</b>	<b>106</b>
<b>5. SVCT2 se expresa <i>in vitro</i> en miotubos de pollos</b>	<b>112</b>
<b>6. La expresión de SVCT2 es modificada por patrones de estimulación eléctrica</b>	<b>115</b>

<b>7. La localización subcelular de SVCT2 es modificada en respuesta a depolarización eléctrica</b>	<b>117</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>119</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>121</b>



**ÍNDICE DE FIGURAS**

		<b>Página</b>
Figura 1	Representación esquemática de una fibra muscular esquelética adulta	4
Figura 2	Representación esquemática del fraccionamiento subcelular de músculo esquelético adulto	43
Figura 3	Expresión de SVCT2 en músculo esquelético de pollo adulto	48
Figura 4	SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo adulto	49
Figura 5	Determinación de la actividad NADH-TR en los músculos esqueléticos de pollo durante el desarrollo post-natal	51
Figura 6	Caracterización morfológica y metabólica de las fibras musculares esqueléticas de pollo durante la etapa post-natal	53



Figura 7	La determinación de la actividad mATPasa permite identificar los fenotipos lentos y rápidos en músculos esqueléticos de pollo adulto	54
Figura 8	Los músculos esqueléticos definen su fenotipo durante la etapa post-natal	57
Figura 9	Los niveles de ARNm de SVCT2 decaen durante el desarrollo post-natal	58
Figura 10	SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo durante la etapa embrionaria tardía	61
Figura 11	SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo durante la etapa post-natal temprana	62
Figura 12	SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo durante la etapa adulta	64

- Figura 13 SVCT2 se distribuye a nivel de las fibras musculares lentas oxidativas en distintos músculos esqueléticos de pollo adulto 65
- Figura 14 La expresión de SVCT2 está restringida a fibras lentas oxidativas en el músculo esquelético humano 66
- Figura 15 SVCT2 se distribuye intracelularmente bajo un patrón estriado transversal en fibras musculares lentas oxidativas de pollo adulto 68
- Figura 16 El patrón estriado transversal de SVCT2 se distribuye de forma similar en distintos músculos esqueléticos de pollo 69
- Figura 17 Comparación de la localización de SVCT2 respecto a titina, miomesina y desmina en fibras musculares lentas 71

Figura 18	Comparación de la localización de SVCT2 respecto a proteína C lenta, miomesina y RyR en fibras musculares lentas	72
Figura 19	El análisis de microscopia confocal demuestra que SVCT2 se localiza en dominios de membrana intracelular	74
Figura 20	SVCT2 se localiza en dominios internos de membrana en las fibras musculares lentas de humanos	75
Figura 21	SVCT2 segrega en microsomas pesados obtenidos de fibras musculares esqueléticas de pollo adulto	77
Figura 22	Enriquecimiento de SVCT2 y proteínas musculares en fracciones de membranas tratadas con fuerza iónica y detergente	80
Figura 23	Enriquecimiento de SVCT2 y proteínas musculares en fracciones de membranas tratadas con detergente y fuerza iónica	82

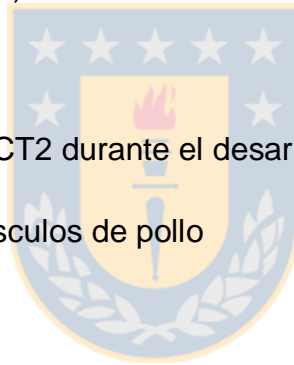
Figura 24	La detección de SVCT2 es bloqueada específicamente por su péptido inhibitorio	83
Figura 25	SVCT2 se expresa en cultivos primarios de miotubos de pollo y se distribuye intracelularmente en forma similar a lo observado <i>in vivo</i>	85
Figura 26	SVCT2 se expresa en miotubos de pollo y co-distribuye con Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPasa a nivel de la fracción enriquecida en proteínas de membrana	87
Figura 27	La expresión de SVCT2 es incrementada por la depolarización de membrana inducida por electroestimulación en fibras aisladas de ratón	89
Figura 28	La expresión de SVCT2 es incrementada por la depolarización de membrana inducida por electroestimulación en miotubos de ratón	91

- Figura 29 SVCT2 altera su distribución intracelular en fibras musculares esqueléticas en respuesta a la depolarización de membrana inducida por electroestimulación 92
- Figura 30 Modelo propuesto para el ingreso de AA mediado por SVCT2 y la inducción y/o mantención del fenotipo lento en fibras musculares esqueléticas 94



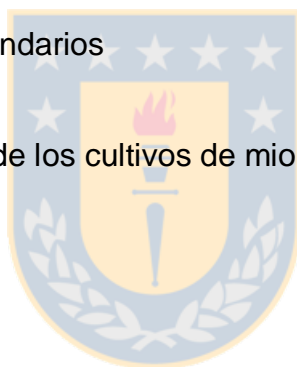
**ÍNDICE DE ANEXOS**

		<b>Página</b>
Anexo 1	Estandarización de cortes de músculo esquelético para inmunohistoquímica	95
Anexo 2	SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas durante el estadio post-natal temprano (30 días)	96
Anexo 3	Expresión de SVCT2 durante el desarrollo post-natal de músculos de pollo	97



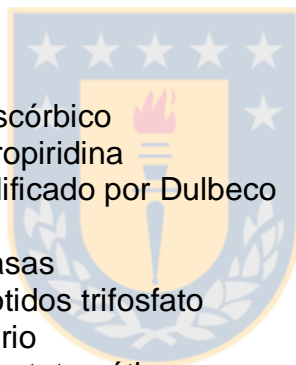
**ÍNDICES DE TABLAS**

		<b>Página</b>
Tabla 1	Partidores de ADN utilizados para los ensayos de RT-PCR	26
Tabla 2	Partidores de ADN utilizados para los ensayos de qPCR	27
Tabla 3	Anticuerpos primarios	28
Tabla 4	Anticuerpos secundarios	29
Tabla 5	Estandarización de los cultivos de mioblastos de pollo	32



## ABREVIATURAS

aa:	aminoácido
AA:	ácido L-ascórbico
AA2P:	ácido L-ascórbico 2-fosfato
Abs:	absorbancia
ADNc:	ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
ATP:	adenosina tri-fosfato
bp:	pares de bases nucleotídicas
BSA:	albúmina de suero de bovino
°C:	grados Celcius
[(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>i</sub> ]:	concentración de calcio intracelular
CaN:	calcineurina
CaMK:	calmodulina quinasa
CK:	creatina quinasa
CoQ <sub>10</sub> :	co-enzima Q <sub>10</sub>
CS:	citrato sintasa
d:	día
DHA:	ácido L-dehidroascórbico
DHPR:	receptor de dihidropiridina
DMEM:	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNasas:	desoxirribonucleasas
dNTPs:	desoxirribonucleótidos trifosfato
E:	estadío embrionario
EDTA:	ácido etilendiaminotetracético
EGTA:	ácido etilenglicoltetracético
ET:	extracto total
FDB:	<i>Flexor digitalis brevis</i>
GAPDH:	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GLUT:	transportador de hexosas
GPDH:	glicerofosfato deshidrogenasa
GPx:	glutación peroxidasa
GSH:	glutación
hrs:	horas
HDAC:	deacetilasa de histonas
HEPES:	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HH:	estadíos embrionarios de pollo (Hamburger-Hamilton)
HRP:	peroxidada de rábano picante
Hz:	Hertz (frecuencia)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	peróxido de hidrógeno
IgG:	inmunoglobulina G
IP3R:	receptor de inositol 3 fosfato





Kb:	kilo base
KCl:	cloruro de potasio
kDa:	kilo Dalton
Km:	constante de Michaelis-Menten
LDA:	<i>Latissimus dorsi anterior</i>
LDH:	lactato dehidrogenasa
LDP:	<i>Latissimus dorsi posterior</i>
M:	molar
mA:	mili Amperios
MA:	<i>Medial adductor</i>
mATPasa:	ATPasa miofibrilar
MEF2:	factor estimulador muscular 2
mg:	mili gramos
MHC:	cadena pesada de miosina
min:	minutos
mL:	mili litros
mM:	mili molar
MP:	microsomas pesados
n:	número de elementos analizados
NaCl:	cloruro de sodio
NADH-TR:	nicotinamida adenina dinucleótido-tetrazolium reductasa
NAD(P)H:	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NFAT:	factor nuclear de linofictos T activados
NF- $\kappa$ B:	factor de transcripción nuclear kappa B
nm:	nanómetro
nM:	nano Molar
NO:	óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	superóxido
Oligo dT:	oligonucleótido desoxitimidina fosfato
p:	probabilidad estadística
P:	estadío post-natal
P3:	pellet 3 (derivado de microsomas pesados)
P4:	pellet 4 (derivados de pellet 3)
PBS:	tampón fosfato salino
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PFA:	paraformaldehído
PFK:	fosfofructoquinasa
PGC-1 $\alpha$ :	Co-activador transcripcional receptor activado de proliferación de peroxisoma
PKA o PKC:	proteína quinasa A o C
PM:	<i>Pectoral mayor</i>
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF:	polifluoruro de vinilideno
qPCR:	PCR tiempo real

RNasas:	ribonucleasas
RNS:	especies reactivas del nitrógeno
rpm:	revoluciones por minuto
RT:	transcripción reversa
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción reversa
Rs:	<i>Rhomboides superficialis</i>
RS:	retículo sarcoplásmico
ROS:	especies reactivas del oxígeno
RyR:	receptor de rianodina
S1:	sobrenadante 1 (derivado de extracto total)
S2:	sobrenadante 2 (derivado de microsomas pesados)
S3:	sobrenadante 3 (derivado de pellet 3)
SBF:	suero bovino fetal
SDH:	succinato dehidrogenasa
seg:	segundos
SEM:	error estándar de la media
SERCA1:	Ca <sub>2+</sub> /ATPasa de retículo sarco endoplásmico rápido
SERCA2:	Ca <sub>2+</sub> /ATPasa de retículo sarco endoplásmico lento
SDS:	lauril sulfato de sodio
SOD:	superóxido dismutasa
SVCT:	Co-transportador de vitamina C y sodio
TAE:	tampón Tris acetato EDTA
TBS:	tampón tris salino
TT:	túbulos transversos
TX-100:	tritón X-100
TEMED:	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamida
Tris:	Tris(hidroximetil)amino-metano
U:	unidad enzimática
UV:	ultravioleta
V:	voltios
V <sub>máx</sub> :	velocidad máxima
xg:	gravedad centrífuga
μg:	microgramos
μL:	microlitros
μM:	micromolar
μm:	micrómetro
%p/v:	porcentaje peso volumen
%v/v:	porcentaje volumen volumen

## RESUMEN

Como consecuencia de su actividad física normal, el músculo esquelético genera especies oxidativas, las que en condiciones de ejercicio intenso, envejecimiento y ciertas patologías pueden producir daños a nivel tisular. Sin embargo, la oxidación es normalmente controlada por diversos mecanismos antioxidantes. Uno de los agentes antioxidantes más importantes del organismo corresponde a la vitamina C, la que se almacena en forma importante, en alrededor de un 50%, a nivel del músculo esquelético.

Según sus propiedades metabólicas y funcionales, las fibras musculares pueden ser agrupadas en lentas y rápidas. El establecimiento definitivo del fenotipo de las fibras depende de la actividad contráctil en etapas post-natales, lo que se traduce en la expresión de genes específicos. Las fibras musculares poseen la capacidad de adaptarse funcionalmente modificando su fenotipo desde rápido a lento y viceversa, proceso denominado *plasticidad muscular*. Se sabe que este proceso está regulado por los niveles intracelulares de calcio. Debido a que importantes proteínas que modulan los niveles intracelulares de calcio son reguladas por el estado redox, la racional de esta tesis es que los niveles intracelulares de vitamina C pueden de alguna manera definir y/o mantener el fenotipo muscular lento.

Recientemente, nuestro laboratorio ha descrito la expresión del transportador de la forma reducida de la vitamina C SVCT2 en fibras musculares lentas de pollo y mamíferos, incluyendo humanos, donde se distribuye con un patrón intracelular. En cultivos de células musculares, hemos descrito que la expresión de SVCT2 es regulada positivamente durante la diferenciación y por la depolarización de membrana.

En su conjunto, estas evidencias nos permitieron plantearnos como hipótesis que: La expresión y localización subcelular del transportador de vitamina C SVCT2 se correlaciona con los cambios fenotípicos y funcionales del desarrollo post-natal del músculo esquelético.

Como primera aproximación experimental, en este trabajo se determinó el patrón de expresión de SVCT2 en músculos esqueléticos durante la etapa adulta, encontrándose preferencialmente en fibras musculares lentas oxidativas. Observamos que SVCT2 se expresa en músculos lentos durante el desarrollo post-natal pero decae progresivamente hacia la adultez comparado con la etapa embrionaria, sugiriendo que la incorporación de vitamina C a través de este transportador tiene distintas funciones durante el desarrollo del músculo esquelético.

Para analizar la localización de SVCT2 en las fibras musculares lentas oxidativas se realizaron ensayos de inmunohistoquímica y fraccionamiento subcelular de membranas de fibras musculares adultas. De forma interesante, encontramos que SVCT2 se distribuye bajo un patrón estriado transversal y que segrega junto a proteínas asociadas a membrana, lo que nos permite sugerir que SVCT2 se localiza en dominios de membrana intracelular. Por comparación topológica con distintos marcadores de membranas internas y del sarcómero, concluimos que SVCT2 se localiza en cercanía al retículo sarcoplásmico. Resultados similares fueron obtenidos en cultivos primarios de miotubos de pollo.

Finalmente, estudiamos el efecto de la actividad contráctil en condiciones que estimulan transiciones fenotípicas sobre la expresión y localización de SVCT2 utilizando cultivos primarios y fibras musculares aisladas de ratón como modelos. Nuestros resultados mostraron un aumento en la expresión de SVCT2 por la depolarización. Por otra parte, este estímulo resultó en un cambio en la distribución subcelular de SVCT2.

Nuestros resultados se insertan en un modelo de trabajo que propone que durante el desarrollo post-natal del músculo la expresión y localización subcelular de SVCT2 modularía el estado redox, lo que a su vez regularía los niveles intracelulares de calcio y, con ello la definición de las características de las fibras musculares hacia un fenotipo lento oxidativo.

## ABSTRACT

As a result of its normal physical activity, skeletal muscle generates oxidative species, that in conditions of intense exercise, aging and certain pathologies can produce damages in this tissue. However, oxidation is normally controlled by diverse antioxidative mechanisms. One of the more important antioxidative agents of the organism corresponds to vitamin C, which is stored in around 50% in skeletal muscles.

According to their metabolic and functional properties, muscle fibers can be grouped in slow and fast. The definitive establishment of the fiber phenotype depends on the contractile activity in post-natal stages, which is translated in the expression of specific genes. Muscle fibers have the ability to adapt modifying their phenotype from fast to slow and vice versa, in a process called muscle plasticity. This process is regulated by intracellular calcium levels. As important proteins that modulate the intracellular calcium levels are regulated by the redox state, the rationale of this thesis is that the intracellular levels of vitamin C can somehow define and/or maintain the slow muscle phenotype.

Our laboratory has recently described the expression of the transporter of the reduced form of vitamin C SVCT2 in slow muscle fibers of chicken and mammals, including humans, where it is distributed with an intracellular pattern. In cultures of muscle cells, we have described that the expression of SVCT2 is positively regulated during the differentiation and by membrane depolarization.

Taken together, these evidences allowed us to raise the following hypothesis: The expression and subcellular localization of the vitamin transporter C SVCT2 is correlated with the phenotypic and functional changes that take place during post-natal development of skeletal muscle.

As a first experimental approach, we determined the expression pattern of SVCT2 in adult skeletal muscles and we found that it is preferentially expressed in oxidative slow muscle fibers. We found that SVCT2 is expressed in slow muscles during post-natal development but decays progressively towards adulthood.

compared with embryonic stages, suggesting that vitamin C incorporation through this transporter has different functions during skeletal muscle development.

In order to analyze the localization of SVCT2 in oxidative slow muscle fibers we performed immunohistochemical analyses and subcellular fractionation of muscle membranes. Interestingly, we found that SVCT2 is distributed under a transversal striated pattern and that segregates along with proteins associated to internal membranes. By comparison with different markers of internal membranes and the sarcomere, we conclude that SVCT2 is located near the sarcoplasmic reticulum. Similar results were obtained in primary cultures of chick myotubes.

Finally, we studied the effect of the contractile activity in conditions that stimulate phenotypic transitions on the expression and localization of SVCT2 using mouse primary cultures of myotubes and isolated muscle fibers as models. Our results showed an increase in the expression of SVCT2 by activity depolarization. On the other hand, this stimulus modified the subcellular distribution of SVCT2.

Our results fit in a working model that proposes that during the post-natal development of the muscle the expression and subcellular localization of SVCT2 would modulate the redox state which, in turn, could regulate the intracellular calcium to define the characteristics of muscle fibers towards an oxidative slow phenotype.

## I. INTRODUCCIÓN

En el músculo esquelético de vertebrados co-existen distintos tipos de fibras musculares, que son clasificadas según criterios morfológicos, histoquímicos, metabólicos, funcionales y de expresión génica en fibras lentas y rápidas (Brooke y Kaiser, 1969; Pette y Staron, 2000; Schiaffino y Reggiani, 1996). Su condición fenotípica puede ser modificada producto de estímulos externos permitiendo cambiar su condición desde lenta a rápida o viceversa, proceso definido como *plasticidad muscular* (Berchtold y cols., 2000; Close, 1965; Dubowitz y Newman, 1967; Pette y Staron, 2001; Pette y Vrbová, 1985).

Como consecuencia de la actividad física normal y otros factores como envejecimiento y ciertas patologías, se incrementa la tasa de síntesis de agentes oxidantes como especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) (Powers y Jackson, 2008). Para contrarrestar el potencial efecto nocivo de los radicales libres, el tejido muscular ha desarrollado y adaptado diversos mecanismos antioxidantes (Powers y Jackson, 2008). La actividad física prolongada o de alta intensidad puede producir daño a las fibras musculares, producto de los excesivos niveles de especies oxidativas que no pueden ser contenidas por la capacidad antioxidante muscular (Halliwell, 1994; McGinley y cols., 2009; Powers y Jackson, 2008). La incapacidad de controlar los oxidantes genera un desbalance en el equilibrio redox, denominado *estrés oxidativo* con potencial impacto en todo el organismo (Banerjee y cols., 2003; Powers y Jackson, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que los ROS estimulan mecanismos antioxidantes convirtiéndolos en moléculas menos reactivas o previniendo la transformación de ROS con menor reactividad a formas más reactivas (McGinley y cols., 2009). Dentro de los agentes antioxidantes que poseen esta propiedad se encuentran los que forman parte del sistema antioxidante no enzimático:  $\beta$ -caroteno, glutatión, ácido úrico, ácido lipoico, vitamina E y vitamina C (McGinley y cols., 2009). Aún cuando la vitamina C es el antioxidante hidrosoluble más importante del organismo, son escasamente conocidas sus funciones y su dinámica de transporte en el músculo esquelético

(Frei y cols., 1989). Recientemente, estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han determinado la expresión de transportador de vitamina C SVCT2 en forma preferencial en fibras musculares lentas tanto en humanos como en otros vertebrados (Low y cols., 2009; Low y cols., 2011). En este trabajo de tesis, abordamos la relevancia de la expresión de SVCT2 en la inducción y/o mantención del fenotipo muscular lento oxidativo.

## **1. Músculo esquelético**

### **1.1. Miogénesis**

El desarrollo del músculo esquelético requiere de una concertada serie de eventos morfogénéticos altamente regulados temporal y espacialmente en el embrión denominado *miogénesis*, que permite la fusión de células musculares progenitoras mononucleadas, *mioblastos* y su posterior diferenciación a células multinucleadas o *miotubos* (Biressi y cols., 2007; Buckingham, 2006; Ciciliot y Schiaffino, 2010; Perry y Rudnick, 2000; Pownall y cols., 2002). Factores extrínsecos secretados por tejidos adyacentes como el tubo neural, notocorda, mesodermo lateral y ectodermo, así como miembros de la familia de factores reguladores de la miogénesis (MRF) han sido identificados y determinado su participación durante la miogénesis (Bryson-Richardson y Currie, 2008; Ludolph y Konieczny, 1995).

Las células musculares son generadas en el embrión en dos etapas. En una fase temprana, la fusión de los mioblastos “embrionarios” origina a los *miotubos primarios*. En la fase tardía, la disposición de mioblastos “fetales” en la superficie de los miotubos primarios resulta en la formación de los *miotubos secundarios* (Duxson y cols., 1989; Kelly y Zacks, 1969). Sin embargo, ambos tipos de miotubos continúan creciendo producto de la fusión sucesiva de mioblastos en el período postnatal (Wigmore y Dungleison, 1998).

Paralelamente a la formación de las fibras musculares, los extremos terminales de las motoneuronas comienzan a migrar hacia las fibras para establecer su inervación (Fredette y Landmesser, 1991a 1991b; Landmesser, 1978). Se ha determinado que la inervación es fundamental en la determinación



del fenotipo de las fibras musculares (Buller y cols., 1960; DiMario y Stockdale, 1997; Rafuse y cols., 1996), permitiendo la activación de mediadores intracelulares y finalmente la expresión de genes y proteínas específicas del fenotipo muscular (Berchtold y cols., 2000; Pette y Staron, 2001).

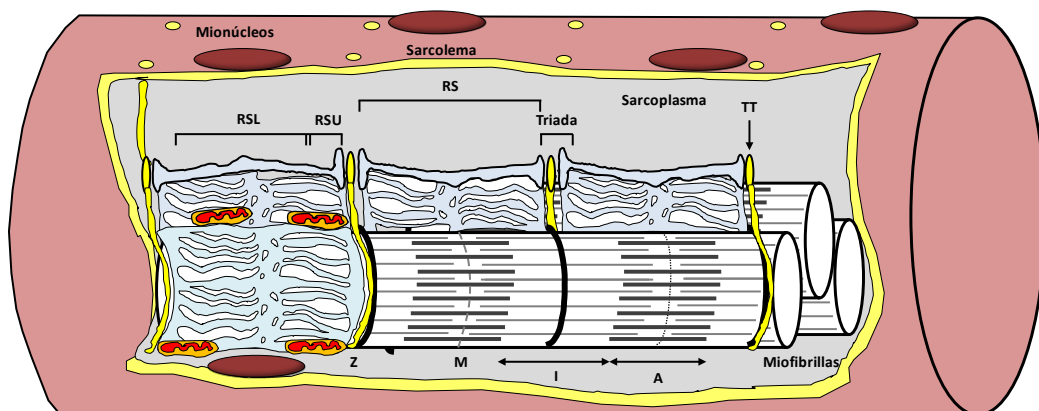
Al final de la miogénesis secundaria se distingue otro tipo celular, las *células satélite* (Biressi y cols., 2007; Zhang y cols., 1998). Estas células se encuentran en la región periférica de la fibra muscular, específicamente entre la lámina basal y la membrana plasmática de la fibra (Mauro, 1961). Durante el desarrollo peri y post-natal un gran número de células satélites se fusionan a las fibras primarias y secundarias ya formadas para contribuir al crecimiento de las fibras musculares (Biressi y cols., 2007). Se ha estimado que más del 90% de los núcleos de las fibras maduras son derivados de mioblastos “adultos” que provienen predominantemente desde células satélites (Zhang y cols., 1998). Durante el desarrollo post-natal estas células entran en una fase quiescente. Sin embargo, pueden ser activadas frente a daño del tejido muscular, permitiendo su regeneración (Ciciliot y Schiaffino, 2010; Collins y cols., 2005; Jansen y Pavlath, 2008).

## 1.2. Estructura del músculo esquelético

El tejido muscular esquelético está constituido por las *fibras musculares* (Berchtold y cols., 2000). Las fibras musculares se asocian en grupos o fascículos envueltos por vainas de tejido conectivo que le otorgan soporte nutricional y estructural al tejido muscular, permitiendo la irrigación sanguínea y el desarrollo de movimiento independiente a cada fibra y fascículo. Externamente el músculo esquelético está rodeado por una capa de tejido conectivo denominada *epimisio*. El epimisio se internaliza en la masa muscular rodeando a todos los fascículos como *perimisio*, el que se contacta con una delgada vaina formada principalmente por fibras reticulares que rodean a cada una de las fibras como *endomisio* (Genneser, 2000).

La fibra muscular corresponde a una célula alargada de forma cilíndrica de longitud y diámetro variable que en humanos su longitud varía desde 1 mm hasta

más de 30 cm. Su diámetro oscila entre 10 a 100  $\mu\text{m}$  (Genneser, 2000). Además, las fibras musculares son multinucleadas en donde la disposición de los núcleos es restringida a las regiones periféricas. La membrana plasmática, denominada *sarcolema*, envuelve completamente a las fibras musculares y penetra en la fibra formando los *túbulos transversos* o *túbulos T*. En el interior de cada fibra muscular, *sarcoplasma*, se distribuyen los organelos como el *retículo sarcoplásmico*, Complejo de Golgi, mitocondrias e inclusiones celulares, como glucógeno y gotitas lipídicas. El sarcoplasma está ocupado mayoritariamente por numerosas fibrillas dispuestas en orientación paralela, denominadas *miofibrillas* (Genneser, 2000). Ultraestructuralmente, las miofibrillas están constituidas por haces de *miofilamentos* alineados, que constituyen los *sarcómeros*. En estos sarcómeros la disposición característica de sus componentes estructurales determina la apariencia estriada propia de este tipo muscular. Cada sarcómero, está constituido por regiones oscuras o banda A flanqueada por dos regiones claras o bandas I, conformada principalmente por actina, troponina y tropomiosina. La banda A, constituida mayoritariamente por miosina, presenta una línea densa central, la línea M, que se encuentra a su vez delimitada por una región translúcida o banda H. Los miofilamentos de actina en la banda I se encuentran anclados a una región densa central denominada línea Z (Genneser, 2000) (Figura 1).



**Figura 1: Representación esquemática de una fibra muscular esquelética adulta.** Retículo sarcoplásmico (RS), retículo sarcoplásmico longitudinal (RSL), retículo sarcoplásmico unión (RSU), túbulos transversos (TT).

Aún cuando las fibras musculares presentan una estructura similar, existen importantes características que permiten distinguirlas en distintos tipos.

### 1.2.1. Criterios de clasificación de las fibras musculares esqueléticas

Las fibras musculares han sido clasificadas según criterios morfológicos, bioquímicos y funcionales en los **tipos I, IIA y IIB**. Las *fibras tipo I*, presentan un metabolismo **oxidativo** en donde la utilización de carbohidratos y lípidos son las principales vías de generación de ATP durante ejercicios prolongados. Por otra parte, presentan una menor actividad ATPásica miofibrilar (mATPasa), una velocidad **lenta** de contracción y son altamente **resistentes a la fatiga**. Esto último se relaciona con una disminución de la función contráctil derivado de la disminución del pH producto de la formación de iones hidrógeno y lactato. Las *fibras tipo IIB*, presentan un metabolismo **glicolítico** siendo la principal vía de síntesis de ATP la degradación de fosfocreatina (PCr) y glicógeno. Además se caracterizan por poseer una mayor actividad mATPasa, una **rápida** velocidad de contracción y son **fácilmente fatigables**. Las *fibras tipo IIA*, presentan un metabolismo **glicolítico** y **oxidativo**, además se caracterizan por una **rápida** velocidad de contracción, alta actividad mATPasa y son medianamente resistentes a la fatiga. Debido a estas características son consideradas como fibras musculares *intermedias* (Ashmore y Doerr, 1971; Barnard y cols., 1971; Morgan y Proske, 1984).

La clasificación de las fibras musculares puede complementarse con la determinación de la expresión de *genes estructurales* como son las isoformas de la cadena pesada de miosina (MHC) (Stockdale y Miller, 1987), de la bomba de calcio ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) (Kaprielian y Fambrough, 1987) y Proteína C (Obinata y cols., 1984), Tropomiosina (Kardami y cols., 1983), Troponina C (Dhoot y Perry, 1979), Troponina I (Koppe y cols., 1989) y Troponina T (Perry, 1998). Así mismo, se distinguen en la expresión de *genes adaptativos* que codifican para enzimas representativas de las vías glicolíticas y aeróbico oxidativas, como lactato dehidrogenasa (LDH), citrato sintasa (CS) y fosfofructoquinasa (PFK) (Plomgaard y cols., 2006). Adicionalmente, la

determinación de la actividad metabólica de enzimas como la succinato dehidrogenasa (SDH), glicerofosfato dehidrogenasa (GPDH) y nicotinamida adenina dinucleótida tetra-zolium reductasa (NADH-TR) y ATPasa miofibrilar (mATPasa) permiten distinguir a estas fibras (Berchtold y cols., 2000; Dubowitz y Brooke, 1973).

Se ha descrito que a nivel de los músculos de las extremidades, abundan las fibras musculares rápidas tipo II (Ijkema-Paassen y Gramsbergen, 2005). En cambio, las fibras musculares lentas tipo I son más abundantes en músculos relacionados con la postura corporal (Ijkema-Paassen y Gramsbergen, 2005). Diversos estudios han determinado que en músculos de ratas, conejos y humanos las fibras presentan una compartimentalización anatómica, ubicándose en las regiones profundas de las masas musculares las fibras tipo I y IIA. En cambio, las fibras tipo IIB se distribuyen en las regiones superficiales (Gottschall y cols., 1980; Johnson y cols., 1973; Lexell y cols., 1994; Sirca y Kostevc, 1985; Sjöström y cols., 1992). La relación existente entre fibras lentas y rápidas dentro de un músculo determina en forma directa la actividad contráctil que ellas desempeñan.

Debido a que nuestro modelo de estudio corresponde a tejido muscular de aves, es importante precisar algunas consideraciones respecto a este tejido en este tipo de animal que difiere en algunos aspectos al de mamíferos.

### **1.2.2. Músculo esquelético en aves**

La clasificación de las fibras musculares en aves es similar a las observadas en mamíferos, es decir se presentan los tipos I, IIA y IIB. Sin embargo, las fibras musculares de aves presentan aspectos diferenciales con respecto a los mamíferos. Para tal efecto, el análisis de los músculos *Latissimus dorsi anterior* (LDA<sub>L</sub>) y *Latissimus dorsi posterior* (LDP<sub>R</sub>) de pollos ha sido clave para establecer estas diferencias, debido a que estos han sido caracterizados por la composición de sus fibras en lento y rápido, respectivamente.

Las fibras musculares lentas observadas en LDA<sub>L</sub> poseen actividad mATPasa idéntica a lo observado en fibras lentas de mamíferos y su patrón de inervación está definido por múltiples puntos de contacto generados por una

misma motoneurona (Page, 1969). El retículo sarcoplásmico en las fibras musculares de aves, se extiende entre los túbulos T dispuestos en las líneas Z separándose en dos secciones: una denominada *retículo sarcoplásmico longitudinal*, constituidos por un sistema de túbulos interconectados que se fusionan a nivel de la línea M, rodeando completamente a la miofibrilla y el *retículo sarcoplásmico de unión*, una sección de túbulos interconectados localizados en estrecha relación a la línea Z (Hikida, 1972; Page, 1969). Sin embargo, desde el punto de vista ultraestructural, la organización del sistema sarcotubular (retículo sarcoplásmico y túbulos T) en fibras lentas es menos ordenada que en fibras rápidas (Hikida, 1987).

Fisiológicamente, las fibras de los músculos LDA<sub>L</sub> de aves presentan una velocidad de contracción 5 a 7 veces más lenta en comparación con fibras rápidas de LDP<sub>R</sub> (Hník y cols., 1967). Esta observación se correlaciona con la capacidad de estas fibras para mantener la tensión por un período más prolongado, participando directamente en la mantención de la postura corporal (Rall y Schottelius, 1973).

### **1.3. Definición del fenotipo de las fibras musculares**

La mayoría de los músculos esqueléticos presentan una composición heterogénea, debido a que en el transcurso de su desarrollo comienza el establecimiento de los distintos tipos de fibras musculares a través de procesos que dependen de la naturaleza de sus precursores musculares (DiMario y Stockdale, 1997; Miller y Stockdale, 1986), la inervación (Buller y cols., 1960; DiMario y Stockdale, 1997; Rafuse y cols., 1996) y la actividad física (Demirel y cols., 1999; Pette y Staron, 2001).

Particularmente en aves, las fibras primarias (miotubos primarios) definen tempranamente su fenotipo en lento o rápido, mientras que las secundarias (miotubos secundarios) poseen un fenotipo rápido (Fredette y Landmesser, 1991b; Stockdale, 1992).

Un aspecto fundamental en la adquisición del fenotipo en las fibras musculares, depende de modificaciones en la expresión génica en respuesta a

diversos estímulos fisiológicos (Bassel-Duby y Olson, 2006; Fluck, 2006; Pette y Staron, 2001). Estos cambios incluyen activación de genes que pueden ser “*adaptativos*”, si modulan una respuesta rápida a estímulos externos, o “*estructurales*”, si resultan en un cambio sostenido en el fenotipo de la fibra muscular (Pette y Staron, 2001). En este sentido, ciertos genes que codifican para enzimas metabólicas se comportan como genes adaptativos (Plomgaard y cols., 2006). De hecho, se ha determinado que la adaptación del músculo esquelético frente a actividad física se encuentra asociada con un incremento en la capacidad respiratoria, reflejado en un alza en los niveles de expresión de algunos componentes de la cadena respiratoria, ATP sintasa, enzimas involucradas en los ciclos del citrato y beta-oxidación de ácidos grasos y el transportador de glucosa GLUT4 (Baar y cols., 2002).

Otro factor importante en la determinación del fenotipo corresponde a la inervación. Durante el desarrollo embrionario, la estructuración de las fibras musculares se acompaña de la migración y el contacto posterior entre los terminales nerviosos motores y las fibras (Buller y cols., 1960; DiMario y Stockdale, 1997). En este sentido, ensayos realizados *in vitro* de miotubos de pollo obtenidos de cultivos de mioblastos provenientes de un músculo lento, *Medial adductor* (MA<sub>L</sub>) como de uno rápido como *Pectoral major* (PM<sub>R</sub>) demuestran que los miotubos, independiente de su origen, expresan el marcador de fenotipo rápido (MHC rápida). Sin embargo, cuando son co-cultivados con explantes de médula espinal de embriones de pollo, sólo los cultivos de origen lento expresan el marcador de fenotipo lento (MHC lenta) (Jiang y cols., 2006; Jordan y cols., 2005). Esto demuestra que la inervación y la naturaleza de los mioblastos regulan mecanismos específicos que conducen a la expresión génica diferencial en las fibras musculares.

Producto de la inervación en las fibras musculares, se desencadenan señales intracelulares que estimulan la liberación sostenida de calcio desde el retículo sarcoplásmico (principal reservorio de calcio en las células musculares), a través de canales altamente especializados presentes en su membrana, como el receptor de rianodina (RyR) y en menor grado por el receptor de inositol trifosfato

(IP3R) (Berchtold y cols., 2000). Las modificaciones en las concentraciones intracelulares de calcio  $[[Ca^{+2}]_i]$  resultan en la activación de mediadores intracelulares y, finalmente, en la expresión de genes específicos que permiten definir el fenotipo muscular (Berchtold y cols., 2000; Pette y Staron, 2001).

## 2. Plasticidad muscular.

El fenotipo de las fibras musculares puede transformarse gradual y reversiblemente desde un fenotipo lento al rápido y viceversa, en un proceso denominado "**plasticidad muscular**". Este proceso ha sido inducido experimentalmente por estudios de inervación cruzada (Close, 1965; Dubowitz y Newman, 1967; Pette y Vrbová, 1985), entrenamiento físico (Demirel y cols., 1999; Pette y Staron, 2001), temperatura (Hirabayashi y cols., 2005), ciertas hormonas (de crecimiento, tiroideas, insulina y sexuales), edad y enfermedades musculares como miotonías y parálisis (Berchtold y cols., 2000). Además se ha inducido *in vitro* en cultivos primarios de miotubos producto de la depolarización (Crew y cols., 2010; Jiang y cols., 2006; Jordan y cols., 2005). Los experimentos de inervación cruzada sugieren una función fundamental de las motoneuronas en la plasticidad muscular, ya sea por el tipo de actividad que evocan o por la presencia de factores secretados diferencialmente por motoneuronas rápidas o lentas en sus contrapartes post-sinápticas. Sin embargo, experimentos de estimulación crónica directa en músculos de rata mostraron transiciones reversibles de fibras musculares (Windisch y cols., 1998). Así, se ha demostrado que la transición fenotípica de las fibras musculares desde uno rápido a lento puede ser realizada a través de la aplicación de patrones eléctricos de baja frecuencia (10 Hz) homologando de esta manera a un ejercicio de resistencia. Este proceso puede ser revertido con la estimulación bifásica de alta frecuencia (100 Hz) de forma similar a lo producido en un ejercicio anaeróbico (Berchtold y cols., 2000).

Estos antecedentes sugieren que la plasticidad muscular estaría mediada por moléculas intracelulares asociadas a la actividad eléctrica y por vías de transducción de señales que resultan en cambios en los niveles de expresión



génica. De hecho, una de las principales modificaciones fenotípicas durante la plasticidad muscular está basada en la sustitución de proteínas estructurales del sarcómero como las cadenas pesadas de miosina (Hoppeler y Flück, 2002; Liu y cols., 2005; Pette y Staron, 2000), Proteína C (Obinata y cols., 1984), Tropomiosina (Kardami y cols., 1983) y del Complejo Troponina (Dhoot y Perry, 1979; Koppe y cols., 1989; Perry, 1998), así como de proteínas relacionadas con la homeostasis de calcio como bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico (Kaprielian y Fambrough, 1987). Sin embargo, las fibras musculares pueden adaptarse frente a estímulos externos sin modificar sus propiedades estructurales, sino que a expensas de modificaciones metabólicas (Plomgaard y cols., 2006). Un ejemplo de esto es PGC-1 $\alpha$  (co-activador 1 $\alpha$ ), factor de transcripción que promueve la biogénesis mitocondrial permitiendo adaptar metabólicamente al músculo frente al ejercicio, que se expresa principalmente en fibras lentas, pero que frente a ejercicio o estimulación eléctrica puede aumentar su expresión en fibras rápidas (Crew y cols., 2010). Interesantemente, la sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  es suficiente para inducir un cambio fenotípico moderado en la fibra, aumentando de forma importante los niveles de enzimas oxidativas (Lin y cols., 2002). De esta manera la expresión de ciertos genes adaptativos en las fibras puede ser modificada en ausencia de regulación de genes estructurales.

### **2.1. Rol del calcio en la plasticidad muscular**

Uno de los factores involucrados en la fisiología muscular y particularmente en el fenómeno de *plasticidad muscular* corresponde al ion calcio. En el músculo esquelético el calcio se encuentra almacenado a nivel del retículo sarcoplásmico y su liberación hacia el sarcoplasma es producida principalmente durante el proceso de contracción muscular (Genneser, 2000).

En respuesta a la depolarización se produce la activación de los receptores de dihidropiridina (DHPR), los canales de calcio sensibles a voltaje, que interactúan directamente con el receptor de rianodina, permitiendo la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico hacia el sarcoplasma (Berchtold y cols., 2000; Genneser, 2000; Gommans y cols., 2002). En condiciones de reposo, la



$[(Ca^{2+})_i]$  es de 50 nM y producto de la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico, esta concentración es elevada localmente en aproximadamente 100 veces (Berchtold y cols., 2000). El calcio liberado al citosol se une al Complejo Troponina posibilitando la interacción entre los filamentos de actina y miosina contrayendo el sarcómero y de esta manera a la fibra y al músculo en su totalidad, mediante la hidrólisis de ATP (Huxley y Hanson, 1954).

Una vez realizada la contracción, los iones  $Ca^{2+}$  a nivel sarcoplásmico se unen a proteínas como calmodulina y parvalbúmina en fibras lentas y rápidas, respectivamente para ser posteriormente reingresados al retículo sarcoplásmico por la bomba  $Ca^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico (Berchtold y cols., 2000).

A través del análisis de las ondas de calcio generadas por depolarización de cultivos primarios de miotubos de rata con altas concentraciones de KCl (84 mM), se ha demostrado que el aumento de calcio intracelular tiene dos componentes, una fase transitoria rápida asociada a procesos de excitación/contracción, regulada por los receptores de rianodina, y una fase transitoria lenta, asociada a procesos de estimulación génica, mediada por los receptores de inositol-3-fosfato (Carrasco y cols., 2003a; Jaimovich y cols., 2000; Jaimovich y Rojas, 1994). En este sentido la activación de las vías de señalización dependientes de calcio son fundamentales para la determinación del fenotipo en las fibras musculares. A la fecha se han determinado al menos 3 posibles vías de señalización que inducen la transición desde el fenotipo rápido a lento en fibras musculares esqueléticas mediada por el incremento sostenido de las concentraciones de calcio intracelular (Liu y cols., 2005; McCullagh y cols., 2004). La primera corresponde a la vía calcineurina/NFAT, en donde la activación de calcineurina (CaN) por calcio produce una desfosforilación y activación del factor de transcripción NFATc (Nuclear factor of activated T-cells) que transloca desde el sarcoplasma al núcleo, induciendo la expresión de genes específicos del fenotipo lento. En la segunda vía, el aumento de  $[(Ca^{2+})_i]$  activa a la calmodulina quinasa (CaMK) fosforilando a la proteína deacetilasa de histonas (HDAC) y liberándola del complejo formado con MEF2 (factor estimulador muscular 2) permitiendo disminuir de esta manera la supresión sobre la expresión de genes

lentos. Por último, una tercera posible vía de señalización que combina las anteriores e involucra la entrada de CaN al núcleo, induciendo una desfosforilación de MEF2 y un incremento en la activación de la expresión de genes del fenotipo lento (Liu y cols., 2005).

La transición fenotípica muscular está en directa relación con una modificación de la actividad metabólica en las fibras. En este sentido, las fibras musculares rápidas que se transforman en lentas llevan asociadas cambios en la expresión de enzimas metabólicas que modifican el metabolismo glicolítico a uno oxidativo, caracterizado por una mayor síntesis de metabolitos oxidantes que representan un potencial daño al tejido muscular si no son regulados eficientemente.

### **3. Especies oxidativas en el músculo esquelético**

#### **3.1. Especies oxidativas y estrés oxidativo**

La síntesis de *radicales libres*, moléculas que poseen una elevada capacidad oxidativa, como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) miembros de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) como óxido nítrico (NO), por parte de las fibras musculares ocurre como consecuencia de la actividad física normal. Sin embargo, esta puede ser fuertemente incrementada bajo condiciones de ejercicio intenso (Davies y cols., 1982; Powers y Jackson, 2008; Reid y Durham, 2002).

El desbalance entre la excesiva producción de radicales libres y metabolitos reactivos y su eliminación por mecanismos especializados, *sistemas antioxidantes*, se define como *estrés oxidativo* (Ďuračková, 2010; Powers y Jackson, 2008). Se ha descrito que la excesiva generación de radicales libres puede producir daño a nivel de estructuras de membrana, fragmentación del ADN y proteínas, generando en las últimas su agregación e incrementando su susceptibilidad a degradación proteolítica (Clarkson y Thompson, 2000; Davies y cols., 1982; Duarte y Lunec, 2005; McGinley y cols., 2009). Aún cuando, los agentes oxidantes producidos en exceso son dañinos, se ha propuesto que bajos niveles de ROS y RNS presentan una influencia directa en la regulación de la actividad contráctil, alterando la

producción de la fuerza y la resistencia muscular, así como la modulación del transporte de glucosa en fibras rápidas (McGinley y cols., 2009; Reid y Durham, 2002). Por otra parte, se ha propuesto que los ROS y RNS ejercen efectos crónicos en la expresión génica muscular mediante la activación de factores de transcripción como HSF1 (factor de transcripción de shock térmico 1) y NF- $\kappa$ B (factor de transcripción nuclear kappa B) (McGinley y cols., 2009; Reid y Durham, 2002).

Estos antecedentes sugieren que los ROS pueden regular la funcionalidad del músculo esquelético y que un entrenamiento físico sistemático podrían resultar en una disminución lenta y progresiva de los niveles de estrés oxidativo. Adicionalmente, la generación de especies oxidativas permitirían inducir la expresión de genes específicos en las fibras musculares.

### **3.2. Mecanismos antioxidantes en el músculo esquelético**

El músculo esquelético ha desarrollado mecanismos *antioxidantes* como una forma de contrarrestar los potenciales efectos nocivos de los radicales libres durante períodos de alta producción de ROS como el ejercicio intenso y prolongado sobre estructuras de membranas, proteínas y el ADN (Powers y Jackson, 2008). Los mecanismos antioxidantes son clasificados como *enzimáticos* y *no enzimáticos*. En el interior de las fibras, estos mecanismos son compartimentalizados a través del sarcoplasma y en organelos como mitocondrias (Powers y Jackson, 2008). Como parte del sistema enzimático, se consideran: *superóxido dismutasa* (MuSOD, CuZnSOD), *glutatión peroxidasa* (GPx) y *catalasa*. Por otra parte, *glutatión* (GSH),  $\beta$ -*caroteno*, *co-enzima Q<sub>10</sub>* (CoQ<sub>10</sub>), *ácido lipoico*, *ácido úrico*, *vitamina E* y *vitamina C*, son considerados como sistemas no enzimáticos (Jackson y Palomero, 2007; McGinley y cols., 2009).

Es por esta razón que una adecuada regulación de los niveles de especies reactivas por parte de las moléculas antioxidantes, como la vitamina C, tendría un rol relevante en la fisiología muscular y particularmente en su adaptación frente a estímulos externos como la actividad física. Es importante señalar que en las fibras musculares lentas con metabolismo oxidativo, los sistemas antioxidantes

presentan una mayor actividad como es el caso de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión (Criswell y cols., 1993; Leeuwenburgh y cols., 1997; Powers y cols., 1994; Powers y Jackson, 2008). En este contexto, la vitamina C podría ser uno de los agentes antioxidantes no enzimático más relevante en la disminución de la alta tasa de especies reactivas generadas como resultado del metabolismo oxidativo de las fibras musculares lentas.

#### 4. Vitamina C

La vitamina C, corresponde a un ácido débil llamado ácido L-ascórbico (AA), posee una estructura de lactona ( $C_6H_8O_6$ ) y sus grupos hidroxilos en las posiciones 2 y 3 se ionizan con valores de pK de 4,17 y 11,57. La forma reducida de AA es el anión ascorbato y es la forma predominante a pH fisiológico en los fluidos corporales (Wilson, 2005). Cuando el anión ascorbato actúa como antioxidante puede ser parcialmente oxidado a ácido semi-dehidroascórbico y posteriormente oxidarse a ácido L-dehidroascórbico (DHA) (Wilson, 2005).

En la mayoría de los mamíferos, la vitamina C es sintetizada a partir de glucosa a nivel hepático (Padayatty y cols., 2003). Sin embargo, distintas especies de mamíferos tales como humanos, primates y cobayos carecen de la capacidad de sintetizar vitamina C *de novo* a partir de azúcares a nivel hepático, debido a la ausencia de la enzima responsable de este proceso por lo que deben necesariamente obtenerla desde la dieta (Nishikimi y Yagi, 1991). Se ha determinado que las concentraciones plasmáticas de vitamina C alcanzan valores del orden de 30-60  $\mu$ M (Capellmann y cols., 1994). Sin embargo, algunos tejidos como la glándula adrenal, el hígado, el bazo y el cerebro, pueden exceder hasta 100 veces las concentraciones plasmáticas de vitamina C (Moser, 1987; Schorah, 1992). Los niveles de AA en el organismo son mantenidos por medio de dos mecanismos; 1) absorción de AA a nivel de las células epiteliales intestinales y 2) reabsorción en las células de los túbulos contorneados proximales del riñón, desde donde se distribuye a los demás tejidos (Castro y cols., 2008; Rose, 1986).

Se ha descrito que la vitamina C cumple distintos roles en diversos procesos biológicos actuando como co-factor enzimático para reacciones como la

hidroxilación post-traducciona del colágeno, la biosíntesis de carnitina, la conversión del neurotransmisor dopamina a norepinefrina, la amidación peptídica y el metabolismo de tirosina. Adicionalmente, vitamina C es un importante regulador del ingreso de hierro desde el tracto gastrointestinal (Duarte y Lunec, 2005; Englard y Seifert, 1986; Hughes y cols., 1980; Wilson, 2005). Sin embargo, la principal función asignada a la vitamina C es la de comportarse como un potente antioxidante frente a las especies oxidantes (Carr y Frei, 1999; Frei y cols., 1989). Debido a la acción antioxidante descrita para la vitamina C, se ha propuesto que su incorporación a la dieta tendría un efecto protector contra la progresión de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares con una importante contribución de daño oxidativo (Duarte y Lunec, 2005; Li y Schellhorn, 2007). Estos antecedentes proponen que la vitamina C regula los niveles de agentes oxidantes y ejerce un efecto protector contra el potencial efecto nocivo de estos en tejidos con una elevada tasa metabólica como es el tejido muscular.

#### **4.1. Vitamina C y su rol como agente antioxidante en el músculo esquelético**

En los últimos años, se ha dado un fuerte énfasis a la posibilidad de que la suplementación con antioxidantes pueda interferir con el estrés oxidativo e inducir adaptación en el músculo esquelético (McGinley y cols., 2009; Peake, 2003; Urso y Clarkson, 2003). De esta manera, diferentes estudios han investigado los efectos de la suplementación con vitamina C y E, individualmente o juntas, para proteger al músculo esquelético de la oxidación inducida por ejercicio (Evans, 2000; McGinley y cols., 2009; Packer, 1997; Yfanti y cols., 2010). Aún cuando los resultados de estos estudios son difíciles de comparar entre ellos debido a los factores considerados en particular en cada estudio, como lo son las diferentes estrategias utilizadas (dosis y tiempo de administración), protocolos de ejercicio y poblaciones heterogéneas (McGinley y cols., 2009) existen estudios que han mostrado una disminución de los niveles de marcadores de daño muscular en pacientes ejercitados tratados con una suplementación de vitamina C (Evans, 2000; Packer, 1997). Sin embargo, otros estudios muestran que los niveles

plasmáticos de marcadores moleculares como creatina quinasa (marcador de daño muscular) o malondialdehído (MDA) (marcador de peroxidación lipídica), así como los síntomas de daño muscular como dolor y debilidad, disminuyen levemente en pacientes tratados con vitamina C (Thompson y cols., 2001; Yfanti y cols., 2010). Por lo tanto, aún existe controversia respecto del efecto protector de vitamina C contra el estrés oxidativo en el músculo esquelético (McGinley y cols., 2009; Peake, 2003).

Un aspecto importante es que los potenciales efectos positivos de vitamina C sobre el equilibrio redox intracelular dependerán de la existencia de sistemas transportadores de alta afinidad en las células potencialmente afectadas.

## **5. Sistemas transportadores de vitamina C**

Tanto la forma reducida (AA) como oxidada (DHA) de la vitamina C pueden ser incorporadas a las células, aunque por distintos sistemas transportadores (Wilson, 2005). DHA es internalizado por transportadores facilitativos de hexosas o GLUTs (Rumsey y cols., 2000; Rumsey y cols., 1997), mientras que AA es incorporado por transportadores especializados denominados co-transportadores de sodio y vitamina C, o SVCTs (Daruwala y cols., 1999; Tsukaguchi y cols., 1999).

Existe importante evidencia de la presencia de transportadores funcionales de vitamina C en distintos tejidos. Experimentos de pulso y caza con vitamina C radioactiva han demostrado que esta molécula se almacena en tejidos, tales como el hígado y los pulmones, donde se detectó un porcentaje importante de la marca radioactiva total (Toutain y cols., 1997). Sin embargo, de acuerdo a su abundancia relativa, se determinó que el músculo esquelético almacena el mayor porcentaje (alrededor de un 50%) de la vitamina C incorporada por los distintos tejidos, donde alcanza concentraciones de 3-15 mg/100 gramos de tejido (McGinley y cols., 2009; Peake, 2003; Toutain y cols., 1997). Estos antecedentes sugieren fuertemente que en el tejido muscular esquelético deberían expresarse transportadores funcionales que permitan internalizar vitamina C en las fibras.

### 5.1. Transporte de DHA mediado por GLUTs en músculo esquelético

Los transportadores GLUT corresponden a una familia constituida por 14 miembros, de los cuales 13 son transportadores de hexosas como glucosa y fructosa (Augustin, 2010). Se ha descrito que la incorporación de DHA es al menos producida por tres isoformas de los GLUTs (GLUT 1, GLUT 3 y GLUT 4) (Rumsey y cols., 2000; Rumsey y cols., 1997). Una vez incorporado, el DHA puede ser reducido intracelularmente a AA por diferentes sistemas enzimáticos (Bánhegyi y cols., 1997; Braun y cols., 1997; Liang y cols., 2001; Nualart y cols., 2003).

En células musculares la expresión de distintas isoformas de GLUTs (1, 3 y 4) ha sido reportada tanto *in vitro* en la línea celular L6 (Bilan y cols., 1992; Mitsumoto y cols., 1991) como *in vivo* en músculo esquelético de rata, humano y en pollo (Carver y cols., 2001; Guillet-Deniau y cols., 1994; Stuart y cols., 2000). Otras isoformas, como GLUT5 (Stuart y cols., 2006), GLUT8 (Gaster y cols., 2004), GLUT11 (Doege y cols., 2001) y GLUT12 (Stuart y cols., 2006) también se han detectado en músculo esquelético. Lo que sugiere la existencia de estas vías de transporte de vitamina C en las células musculares.

### 5.2. Transporte de AA mediado por los co-transportadores de sodio y vitamina C (SVCTs) en el músculo esquelético

#### 5.2.1. Características generales

Los co-transportadores de sodio y vitamina C pertenecen a una familia de proteínas que incluye a transportadores de nucleobases, tales como purina permeasas (UapC), transportador bacterial de xantina (PbuX) y el transportador de uracilo (UraA) (Faaland y cols., 1998; Meintanis y cols., 2000). Se han descrito dos isoformas de estos transportadores, **SVCT1** y **SVCT2** (Daruwala y cols., 1999; Tsukaguchi y cols., 1999), codificadas por los genes *Slc23a1* y *Slc23a2*, respectivamente (Faaland y cols., 1998; Meintanis y cols., 2000). La estructura predicha mediante análisis de hidrofobicidad, ha determinado que SVCT1 y SVCT2 poseen 12 dominios transmembrana, con los dominios amino (N) y carboxilo (C) terminal localizados intracelularmente (Faaland y cols., 1998; Liang



y cols., 2001). En cuanto a su estructura aminoacídica, SVCT1 y SVCT2 presentan variaciones en su tamaño y masas moleculares según la especie. En rata, SVCT1 y SVCT2 poseen 604 y 592 aa (Tsukaguchi y cols., 1999), mientras que en ratón tienen 605 aa (Faaland y cols., 1998) y 647 aa (Gispert y cols., 2000), respectivamente. En humanos SVCT1 presenta 598 aa, mientras SVCT2 posee 650 aa (Daruwala y cols., 1999; Faaland y cols., 1998; Liang y cols., 2001; Rajan y cols., 1999; Wang y cols., 1999). Adicionalmente, se han identificado sitios potenciales para N-glicosilación y de fosforilación por proteína quinasa A (PKA) y proteína quinasa C (PKC) (Liang y cols., 2001). En cuanto a sus masas moleculares, se ha descrito que SVCT1 y SVCT2 poseen masas entre 65 y 75 kDa (García M de Mde y cols., 2005; Jin y cols., 2005; May y Qu, 2005; Mun y cols., 2006; Wu y cols., 2003a; Wu y cols., 2003b). En tanto en humanos la determinación de las masas moleculares para los SVCTs se presentan como datos controversiales, reportándose similares a las detectadas en ratón y rata (Kang y cols., 2007; Liang y cols., 2002; Lutsenko y cols., 2004) o de aproximadamente 50 kDa como lo observado en neuronas, plaquetas y células de melanoma (Godoy y cols., 2007; Li y cols., 2003; Savini y cols., 2007). En consecuencia, la masa molecular de los transportadores SVCTs parece depender de modificaciones específicas dependientes del tipo celular analizado.

Otro aspecto importante a considerar son las propiedades cinéticas y funcionales de los transportadores, las que al parecer dependen del tipo celular, tejido o especie desde la cuales fueron clonados, así como del sistema de expresión empleado (Savini y cols., 2008). Para las isoformas humanas se han descrito constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) del orden de 65-237  $\mu\text{M}$  para SVCT1 y de 8-62  $\mu\text{M}$  para SVCT2 (Daruwala y cols., 1999; Godoy y cols., 2007; Liang y cols., 2002; Tsukaguchi y cols., 1999; Wang y cols., 2000). Ambas isoformas poseen también diferente capacidad para transportar AA. En todos los sistemas de expresión analizados, SVCT1 muestra una mayor velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) que SVCT2 para el transporte de AA (Savini y cols., 2008). De esta manera, SVCT2 se ha definido como un transportador de alta afinidad/baja capacidad mientras SVCT1 es de baja afinidad/alta capacidad.



### 5.2.2. Regulación de los transportadores SVCTs

Diversos ensayos *in vitro* han determinado que la síntesis de SVCT2 es incrementada como respuesta a distintos agentes, como el factor de crecimiento epidérmico en una línea celular de trofoblastos humanos (Biondi y cols., 2007) y en la activación de plaquetas humanas con ésteres de forbol o trombina (Savini y cols., 2007). De manera similar, se ha demostrado que la expresión del SVCT2 es regulada durante la diferenciación de células nerviosas, óseas, cartilaginosas y dérmicas (Eldridge y cols., 1987; Franceschi y cols., 1994; Freyria y cols., 1999; Le Nihouannen y cols., 2010; Lee y cols., 2003; Savini y cols., 2002; Sung y cols., 2008; Yan y cols., 2001). Por otra parte, se ha determinado que la expresión y funcionalidad de los SVCTs es regulada por modificaciones post-traduccionales del tipo N-glicosilación y fosforilación debido a la presencia de sitios de regulación en la secuencia aminoacídica (Faaland y cols., 1998; Liang y cols., 2001; Subramanian y cols., 2008; Tsukaguchi y cols., 1999). Otra posible forma de regulación de los SVCTs es la presencia de variantes de *splicing* de ambos transportadores (Lutsenko y cols., 2004; Wang y cols., 1999). Para el caso particular de SVCT1, se ha descrito una variante que presenta una inserción de 4 aminoácidos (VGLH), ubicados entre E155 y V156, la que no sería funcional respecto al transporte (Wang y cols., 1999). En cambio en hSVCT2, la variante corresponde a una proteína truncada de sus dominios transmembrana 5, 6 y parte del 4 con respecto a la proteína original, y que actuaría como dominante negativo del transporte de vitamina C (Lutsenko y cols., 2004).

Las diferencias en cuanto a las propiedades cinéticas y los mecanismos de regulación de los SVCTs sugieren que ambas isoformas podrían tener un rol funcional en el organismo. Es por este motivo que se ha estudiado su distribución y patrón de expresión en los diferentes tejidos.

### 5.3. SVCTs en el músculo esquelético

La caracterización inicial del patrón de expresión de SVCTs mediante ensayos de Northern blot no mostró resultados positivos en músculo esquelético (Tsukaguchi y cols., 1999). Evidencias posteriores mostraron una débil expresión

del transcrito de SVCT2 en músculo esquelético de ratón (Kuo y cols., 2004). Además, ratones heterocigotos SVCT2<sup>+/-</sup> mostraron una disminución de AA en músculo esquelético, lo que sugiere que SVCT2 es funcional en este tejido (Kuo y cols., 2004). Posteriormente, el ARNm de SVCT2 fue detectado en dos líneas celulares musculares, C2C12 de ratón y L6C5 de rata (Savini y cols., 2005). En ambas líneas celulares se demostró que los niveles de expresión del ARNm para SVCT2 y el transporte de AA disminuyen durante la diferenciación muscular *in vitro* (Savini y cols., 2005). Por otra parte, se ha establecido que la expresión de SVCT2 a nivel de ARNm y proteína son reguladas positivamente por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en miotubos C2C12 sugiriendo que la expresión del transportador se comporta como una respuesta adaptativa inducida por el balance redox (Savini y cols., 2007). Estudios recientes algunos de los cuales forman parte de esta tesis, han permitido clonar SVCT2 desde pollo como una proteína de 685 aa y una alta identidad con el SVCT2 de ratón y humano. Por otra parte, dichos estudios han determinado que la expresión de SVCT2 se restringe a fibras lentas oxidativas de pollo, mamíferos y humano. Estos antecedentes nos sugieren que la expresión del transportador determinaría la biodisponibilidad de vitamina C en las fibras musculares y permitiría la expresión de genes específicos para la determinación del fenotipo lento.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad física normal y particularmente el ejercicio intenso, edad y ciertas patologías, generan especies oxidativas con potencial efecto nocivo para las células del organismo (Ďuračková, 2010; Halliwell, 1994; McGinley y cols., 2009; Powers y Jackson, 2008). Con el propósito de contrarrestar su acción, el tejido muscular utiliza diversos sistemas antioxidantes (Duarte y Lunec, 2005; McGinley y cols., 2009; Powers y Jackson, 2008), entre ellos la vitamina C (Evans, 2000; Jackson y Palomero, 2007; McGinley y cols., 2009; Powers y Jackson, 2008). Estudios de pulso y caza han permitido determinar que la captación de la vitamina C por parte del tejido muscular es de alrededor de un 50% del total de vitamina C del organismo, sugiriendo que el músculo esquelético expresa transportadores funcionales para internalizar vitamina C (Toutain y cols., 1997). De forma interesante, se ha establecido que la expresión de SVCT2 en células musculares, es regulada positivamente por variaciones en el estado redox como consecuencia de agentes oxidantes (Savini y cols., 2007). Otro aspecto interesante de la vitamina C es que altos niveles son observados durante la formación de las fibras musculares durante la miogénesis (Wilson, 1990). Sumado a los reportes que sugieren que la incorporación de vitamina C mediada por SVCT2 participa de la diferenciación celular (Eldridge y cols., 1987; Franceschi y cols., 1994; Freyria y cols., 1999; Savini y cols., 2002; Yan y cols., 2001). Estas evidencias apuntan a que vitamina C participaría en el proceso de miogénesis. Recientemente, se ha determinado que SVCT2 se expresa durante la miogénesis del pollo preferencialmente en fibras musculares lentas (Low y cols., 2009) y que su patrón de distribución se mantiene en otros vertebrados incluido el ser humano.

Desde la etapa embrionaria el músculo esquelético está constituido por fibras musculares que pueden ser clasificadas en lentas y rápidas según criterios histoquímicos, histológicos y de expresión génica (Barnard y cols., 1982; Berchtold y cols., 2000; Brooke y Kaiser, 1969; Pette y Staron, 2000; Schiaffino y Reggiani, 1996). Diversas aproximaciones experimentales *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el fenotipo de las fibras musculares puede sufrir modificaciones

observándose una transición desde un fenotipo lento hacia uno rápido y desde uno rápido al lento, fenómeno conocido como *plasticidad muscular* (Close, 1965; Pette y Staron, 2001; Pette y Vrbová, 1985). Este proceso de adaptación está mediado por moléculas intracelulares asociadas a la actividad eléctrica y por vías de transducción de señales que resultan en cambios en los niveles de expresión génica (Bassel-Duby y Olson, 2006; Casas y cols., 2010; Crew y cols., 2010; Jordan y cols., 2005). Nuestro laboratorio ha sugerido que la expresión de SVCT2 permite definir fenotípicamente a las fibras musculares, comportándose de esta manera como un marcador temprano del fenotipo lento (Low y cols., 2009; Low y cols., 2011). Por este motivo, nosotros proponemos como hipótesis de trabajo que *“La expresión y localización subcelular del transportador de vitamina C SVCT2 se correlaciona con los cambios fenotípicos del desarrollo post-natal del músculo esquelético”*.



### III. HIPÓTESIS

*“La expresión y localización subcelular del transportador de vitamina C SVCT2 se correlaciona con los cambios fenotípicos del desarrollo post-natal del músculo esquelético”*

#### OBJETIVO GENERAL

Determinar que la expresión y localización subcelular de SVCT2 se correlaciona con los cambios fenotípicos de las fibras musculares durante la etapa post-natal.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión de SVCT2 en músculos esqueléticos de pollo durante la etapa post-natal.
2. Definir la localización subcelular de SVCT2 en músculo esquelético de pollo adulto.
3. Analizar los niveles de expresión y localización de SVCT2 en condiciones de inducción y/o mantención del fenotipo lento.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

#### 1.1. Animales de experimentación

Pollos adultos (*Gallus gallus*): gallinas raza Leghorn de 7, 15 y 30 días post-natal y adultas (8 semanas de edad)

Embriones de pollo: huevos de pollo raza Leghorn fertilizados fueron mantenidos a 37,5° C en una incubadora con ventilación forzada y con volteo manual. Los embriones fueron clasificados según el criterio de Hamburger y Hamilton (HH) (Hamburger y Hamilton, 1992)

Humano: muestras de músculo humano normal se obtuvieron quirúrgicamente desde un paciente adulto con lesión en la médula espinal en el Hospital Guillermo Grant Benavente (Concepción, Chile).

Ratones: Ratones neonatos C57 (P0 o P1) fueron utilizados para la obtención de cultivos primarios de miotubos.

Ratones Balb/c machos de 5 a 7 semanas de edad fueron utilizados para el aislamiento de fibras del músculo *Flexor digitalis brevis* (FDB)

#### 1.2. Cultivo celular

Miotubos de pollo: mioblastos derivados de embriones de pollo que se diferencian en miotubos multinucleados.

Miotubos de ratón: mioblastos derivados de embriones de ratón o ratones recién nacidos (P0 o P1) que se diferencian en miotubos multinucleados

Fibras aisladas de ratón adulto: fibras musculares esqueléticas obtenidas desde ratones Balb/c adultos

#### 1.3. Soluciones de cultivo celular

Extracto de embrión de pollo: extracto de embriones de pollo de 12 días de incubación (estado 37, HH37) (Hamburger y Hamilton, 1992) fue utilizado como fuente de factores de crecimiento para la proliferación de mioblastos y diferenciación de de los miotubos de pollo.

Medio DMEM (Hyclone): contiene 4,5 gr/L de D-glucosa; 4 mM L-Glutamina y 3,7 gr/L de NaHCO<sub>3</sub>. Medio utilizado para preparar los medios de cultivo celular.

Medio de crecimiento para mioblastos de pollo: DMEM suplementado con 20% suero bovino fetal (SBF) (Hyclone); 2% extracto de embrión de pollo; 100 µg/mL penicilina (Hyclone); 100 U/mL esteptomicina (Hyclone).

Medio de diferenciación para miotubos de pollo: DMEM suplementado con 10% suero equino (Hyclone); 2,5% SBF; 2% extracto de embrión de pollo; 100 µg/mL penicilina; 100 U/mL esteptomicina.

Medio de crecimiento para mioblastos de ratón: DMEM-F12 en proporción 1:1 v/v suplementado con 10% suero equino; 2,5% SBF; 100 µg/mL penicilina y 100 U/mL esteptomicina.

Medio de diferenciación para miotubos de ratón: DMEM-F12 en proporción 1:1 v/v; 100 µg/mL penicilina y 100 U/mL esteptomicina.

Medio de mantención para fibras aisladas de ratón (DMEM-HS 10%): DMEM suplementado con 10% suero equino adulto (Hyclone).

Tripsina-EDTA (0,025%) (Hyclone): utilizada para desahderir los mioblastos de ratón desde las placas de cultivo.

#### **1.4. Soluciones de fraccionamiento subcelular de membranas musculares**

Tampón A: 25 mM Tris HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA y 1 mM PMSF.

Tampón B: 25 mM Tris HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA y 1 mM PMSF.

Tampón C: 25 mM Tris HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF y 0,5% TX-100.

Tampón D: 25 mM Tris HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF y 0,5% TX-100.

### 1.5. Enzimas

DNasa I (Fermentas), Affinity Script reverse transcriptase (Stratagene) y KAPA Taq DNA polimerase (KAPA Biosystems)

### 1.6. Reactivos y soluciones ultrapuras

TRIzol (Invitrogen), Inhibidor de RNasas (New England Biolabs), dNTPs (Omega, BioTek), EDTA 25 mM (Stratagene); estándares de DNA de 100 bp (New England Biolabs), oligonucleótido OligodT (New England Biolabs), BSA 10 mg/mL (New England Biolabs), mezcla de inhibidores de proteasas (104 mM AEBSF; 80 mM Aprotinina; 2 mM Leupeptina; 4 mM Bestatina; 1,5 mM Pepstatina A; 1,4 mM E-64; Sigma), estándares de proteínas (New England Biolabs), reactivo de cuantificación de proteínas (reactivo de Bradford, BiorRad), Colagenasa tipo II (Worthington), matriz de adhesión celular para fibras aisladas (Biosciences), colágeno tipo I para adhesión celular de miotubos de ratón (Sigma), BTS (*N-Benzil-p-tolueno sulfonamida*)(Sigma), AraC (Sigma), medio de cultivo HAMS (Gibco) y gelatina (Sigma).

### 1.7. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se indican en las tablas N° 1 y 2.

**Tabla 1: Partidores de ADN utilizados para los ensayos de RT-PCR.** Lista de partidores utilizados para determinar la expresión de SVCT2 y  $\beta$ -actina de pollo.

Nombre	Partidor 5' (5'-3')	Partidor 3' (5'-3')	Tm	Producto (pb)
<b>SVCT2</b> <i>pollo</i>	TGCCAGATTGTCTTGTGCTC	GCCTTCCAGTGACTTGCTTC	58	589
<b><math>\beta</math>-actina</b> <i>pollo</i>	ACGTCGCACTGGATTTTCGAG	TGTCAGCAATGCCAGGGTAC	60	282



**Tabla 2: Partidores de ADN utilizados para los ensayos de qPCR.** Lista de partidores utilizados para determinar la expresión de SVCT2, Troponina I lenta (TnIs) y  $\beta$ -actina de ratón.

Nombre	Partidor 5' (5'-3')	Partidor 3' (5'-3')
<b>SVCT2</b> <i>ratón</i>	TGCCAGGAAGGGTGTACTTC	CCGGTACCAAATATGCCATC
<b>TnIs</b> <i>ratón</i>	GAGGTTGTGGGCTTGCTGTATGA	GGAGCGCATATTAGGGATGT
<b><math>\beta</math>-actina</b> <i>ratón</i>	TCTACAATGAGCTGCGTGTG	TACATGGCTGGGGTGTGAA

### 1.8. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados se indican en las tablas N° 3 y 4.



**Tabla 3: Anticuerpos primarios.** Se utilizó la dilución indicada para las distintas técnicas. IHQ: Inmunohistoquímica y WB: Western blot.

<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen</b>	<b>Propósito</b>	<b>Dilución</b>
<b>SVCT2 (G-19)</b>	Policlonal	Cabra	Santa Cruz	IHQ/WB	1/100 1/200
<b>Miosina lenta (S58)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ	1/100
<b>Miosina rápida Humana (A 4.74)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ	1/50
<b>SERCA rápido (5D2)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ	1/50
<b>SERCA lento (CaS/C1)</b>	Monoclonal	Ratón	Hibridoma Bank	IHQ /WB	1/10
<b>Proteína C Rápida (MF1)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	WB	1/100
<b>Proteína C lenta (ALD66)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ /WB	1/100
<b>Miomesina (mMaC myomesin B4)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ /WB	1/100
<b>Titina (9D10)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ	1/100
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (<math>\alpha</math>5)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	WB	1/100
<b>RyR (34C)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ	1/10
<b>Desmina (D3)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ	1/50
<b>Laminina (3H11)</b>	Monoclonal	Ratón	Hybridoma Bank	IHQ	1/200
<b><math>\beta</math>-actina (I-19)</b>	Policlonal	Cabra	Santa Cruz	WB	1/2000
<b>Péptido inhibitorio SVCT2 (G-19) P</b>	Péptido Inhibitorio	Rata	Santa Cruz	WB	1/10

**Tabla 4: Anticuerpos secundarios.** Se utilizaron anticuerpos conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) y fluoróforos en las dilución indicadas para las distintas técnicas: IHQ: Inmunohistoquímica y WB: Western blot.

Antígeno	Origen	Señal	Propósito	Dilución
<i>IgG cabra</i>	JacksonImmunoResearch	HRP	WB	1/500
<i>IgG ratón</i>	JacksonImmunoResearch	HRP	WB	1/500
<i>IgG cabra</i>	Invitrogen	Alexa Fluor 488	IHQ	1/300
<i>IgG ratón</i>	Invitrogen	Alexa Fluor 488	IHQ	1/300
		Alexa Fluor 546		1/300
		Alexa Fluor 633		1/300

### 1.9. Kit comerciales

Western Lightning Chemilumminescence Reagent Plus (PerkinElmer): reactivos que revelan por quimioluminiscencia de la actividad peroxidasa de rábano conjugada a anticuerpos secundarios en ensayos de Western blot.

Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent): mezcla de reactivos especialmente formulada para la detección de DNA doble hebra unido a SYBR Green I (Taq DNA polimerasa mutante termoactiva, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y SYBR Green I).

### 1.10. Reactivos y soluciones en general

Agarosa (Lonza), APS (Persulfato de amonio al 10%, Sigma), bromuro de etidio (10 mg/mL, Sigma), etanol (Merck), cloroformo (Merck), HCl (10 M, Merck), isopentano (Merck), nitrógeno líquido, medio inclusión OCT (Tissue-Tek), PBS 1X (136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4), Solución de disección (20 mM glucosa; 44 mM sacarosa; 10 mM HEPES; 0.27 mM NaCl; 0.01 mM KCl; 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4), solución de

acrilamida 30% (29% p/v acrilamida; 1% p/v bisacrilamida, Sigma), solución de “stripping” (62,5 M Tris-HCl pH 6,8; 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 2% p/v SDS), TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 100 mM EDTA; pH 8,0), tampón de electroforesis de proteínas (25 mM Tris-base; 250 mM Glicina; 0,1% p/v; pH 8,3), tampón de carga de proteínas 1X (50 mM Tris-HCl; pH 6,8; 5% p/v  $\beta$ -mercaptoetanol; 2% p/v SDS; 10% v/v Glicerol; 0,1% p/v azul de bromofenol), tampón de transferencia de proteínas (48 mM Tris; 39 mM Glicina; 0,037% p/v SDS; 20% v/v metanol); Rojo ponceau S (0,1% p/v rojo ponceau S, 5% v/v ácido acético; Sigma), Azul de Coomassie (1% p/v azul de coomasie; 30% v/v metanol; 50% v/v agua destilada; 20% v/v ácido acético; Sigma), tampón Tris-fosfato BSA 1% (20,7 mM Tris; 72,3 mM NaCl; 1% p/v BSA), TBS-Tween 20 (72,3 mM NaCl; 20,7 mM Tris; 0,1% v/v Tween 20), TEMED (Sigma) y Vectabond (Vector laboratories).

### 1.11. Materiales en general

Películas fotográficas (Kodak), papel filtro Whatman, cubreobjetos discoidales de vidrio de 12 mm de diámetro, cubreobjetos rectangulares de vidrio de 50 mm, portaobjetos de vidrio, placas de cultivo (100, 60 y 35 mm), pipetas estériles, pipetas Pasteur, filtros de poro 0,2  $\mu$ m y membrana Nytex (Nytex)

## 2. Métodos

### 2.1. Animales de experimentación

Los músculos *Latissimus dorsi anterior* (LDA<sub>L</sub>), *Latissimus dorsi posterior* (LDP<sub>R</sub>), *Medial abductor* (MA<sub>L</sub>) y *Pectoralis major* (PM<sub>R</sub>) de gallinas raza Leghorn adultas (8 semanas de edad) y de 7, 15, 30 días post-natal fueron extraídos posterior a la práctica de la eutanasia por dislocación cervical (NAS, 2010). Adicionalmente, huevos de pollo raza Leghorn fertilizados fueron mantenidos a 37,5° C en una incubadora con ventilación forzada y con volteo manual. Los embriones fueron clasificados según el criterio de Hamburger y Hamilton (HH) (Hamburger y Hamilton, 1992) y se extrajeron muestras de cerebro y de los músculos antes descritos.

Las muestras de músculo humano se obtuvieron quirúrgicamente desde un paciente adulto con lesión en la médula espinal en el Hospital Guillermo Grant Benavente (Concepción, Chile).

Ratones neonatos C57 (P0 o P1) y machos Balb/c de 5 a 7 semanas de edad fueron utilizados para la obtención de cultivos primarios de miotubos y el aislamiento de fibras derivadas del músculo rápido *Flexor digitalis brevis* (FDB<sub>R</sub>) respectivamente.

## **2.2. Cultivos celulares**

### **2.2.1. Mantención de los cultivos celulares**

Los cultivos celulares utilizados durante el desarrollo de esta tesis fueron mantenidas en una incubadora Thermo Hepa class 100 a 37° C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cambios de medio y siembra celular se realizaron en una cámara de flujo laminar (Nuair). La morfología celular y confluencia se monitoreó periódicamente usando un microscopio invertido (Olympus CK40). Para determinar la concentración celular, se agregó una alícuota de células en suspensión en una cámara de Neubauer, la cual posee 5 cuadrantes que soportan un volumen de 0,1 µL cada uno. Utilizando un aumento de 10X en microscopio de contraste de fases se contó el número de células en cada cuadrante y se obtuvo un promedio de éstas. Se calculó el número de células/mL de suspensión multiplicando el valor anterior por un factor de 10.000.

### **2.2.2. Cultivos primarios de mioblastos de pollo**

Se realizaron cultivos primarios de mioblastos de pollo a partir de los músculos PM<sub>R</sub> y MA<sub>L</sub> de embriones de pollo HH38 (DiMario y Stockdale, 1997; O'Neill y Stockdale, 1972). Los músculos se disecaron y se mantuvieron en solución de disección hasta la ruptura mecánica del tejido, luego de lo cual se incubó con DMEM tripsina/EDTA 0,25% por 15 min a 37°C con agitación suave. El tejido se suspendió en medio de crecimiento y se disgregó mecánicamente con pipeta. Las células se filtraron a través de un filtro triple de nylon y se centrifugaron a 1.500xg por 5 min en una centrífuga Hettich, Rotofix 32A. Se realizó el conteo

celular y se sembró de acuerdo al tipo de placa a utilizar, las cuales fueron previamente cubiertas con gelatina (Sigma) 0,5% p/v por 30 min a 37° C (Tabla 5). Al día siguiente de la siembra, día 1 de cultivo, se realizó cambio de medio de crecimiento y al día 2 de cultivo se cambió por medio de diferenciación (DMEM; 10% suero equino; 2,5% SBF; 2% extracto de embrión de pollo; 100 µg/mL penicilina; 100 U/mL esteptomicina)

**Tabla 5: Estandarización de los cultivos de mioblastos de pollo.** Número de células sembradas en los distintos tipos de placas de cultivo para ser diferenciadas dos días después.

Tipo de placa	Número de células
24-pocillos	120.000
35mm	450.000
60mm	1.000.000

### 2.2.3. Extracto de embrión de pollo

Embriones de pollo HH37 fueron sacrificados por decapitación (NAS, 2010). Las cabezas, extremidades anteriores y posteriores fueron eliminadas y los cuerpos restantes se disgregaron mecánicamente y se pesaron. Se agregó un volumen equivalente al peso de medio HAMS (Gibco). Para la homogeneización de la muestra se utilizó una jeringa, a través de la cual se hizo pasar varias veces el contenido hasta lograr la completa disgregación del tejido y una solución homogénea. Se centrifugó a 760xg por 10 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 12.000xg por 3 min, el extracto fue alicuotado y guardado a -20°C. Todo el proceso se realizó en hielo.

### 2.2.4. Cultivos primarios de miotubos de ratón

A ratones C57BL/6 neonatos (p0-p1) se les aplicó eutanasia por decapitación (NAS, 2010). Seguidamente las extremidades posteriores fueron

separadas y las masas musculares disecadas y digeridas enzimáticamente con colagenasa tipo II a 37°C por 15 min en agitación a 170 rpm. La suspensión fue filtrada a través de membrana Nytex y centrifugada a 1200 rpm por 10 min. El sobrenadante obtenido fue preplaqueado por 30 min para obtener un enriquecimiento de mioblastos. Las células fueron recuperadas y sembradas en placas de 60 mm en medio de crecimiento de mioblastos de ratón. Para eliminar los fibroblastos remanentes 10 µM de arabinosilcitosina (AraC) fue agregado durante el comienzo de la etapa de alineamiento de los mioblastos. Posteriormente para inducir diferenciación, las células fueron cultivadas en medio de diferenciación de miotubos en placas Petri de 35 mm con colágeno tipo 1 como sustrato de adhesión. Los experimentos fueron desarrollados al día 4 de diferenciación.

### **2.2.5. Aislamiento de fibras musculares esqueléticas de ratón adulto**

Ratones BALB/c fueron eutanasiados por dislocación cervical (NAS, 2010). El músculo rápido *Flexor digitalis brevis*, de ambas extremidades fue disecado y mantenido en PBS 1X estéril. Para la separación de fibras musculares, los músculos fueron digeridos en colagenasa tipo II por 90 min a 37°C en agitación a 170 rpm. Posteriormente los músculos fueron incubados a 37°C en medio DMEM-HS 10% y las fibras fueron separadas por medio de la acción mecánica por pasajes en pipetas Pasteur de vidrio. Finalmente las fibras fueron sembradas proporcionalmente en placas Petri de 35 mm tratadas con Matrigel™.

## **2.3. Estimulación eléctrica**

### **2.3.1. Estimulación eléctrica en miotubos de ratón**

La estimulación eléctrica de los miotubos de ratón fue realizada con electrodos de platino conectados a través de una unidad de aislación a un electroestimulador (Grass stimulator S48). A los miotubos se le aplicaron 400 pulsos cuadrados de 300 ms de duración con una frecuencia de 10 y 50 Hz por 40 y 8 segundos respectivamente. Los miotubos estimulados fueron mantenidos por 2, 4 y 8 hrs post-estimulación en medio de diferenciación hasta su procesamiento.

### **2.3.2. Estimulación eléctrica de fibras aisladas**

Las fibras aisladas fueron mantenidas por 12 hrs a 37°C temperatura, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Previo a la estimulación eléctrica, las fibras fueron incubadas con 25 µM de BTS (*N-benzil-p-tolueno sulfonamida*) por 5 min para inhibir la contracción muscular. La estimulación eléctrica de las fibras fue realizada con electrodos de platino conectados a través de una unidad de aislación a un electroestimulador. A las fibras se le aplicaron 270 pulsos cuadrados de 300 ms de duración con una frecuencia de 20 Hz por 14 seg. Las fibras estimuladas fueron mantenidas por 2, 4, y 8 hrs post-estimulación en medio DMEM-HS 10% hasta su procesamiento.

## **2.4. RT-PCR**

### **2.4.1. Extracción de ARN total**

Se extrajo el ARN total desde cultivos celulares, fibras aisladas y músculos de pollo utilizando TRIzol (Invitrogen), reactivo que optimiza el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi, basado en la extracción por tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Los cultivos celulares sembrados en placas de 35 mm de diámetro fueron homogeneizados en 0,3 ml de TRIzol utilizando micropipeta y los músculos (50-100 mg) fueron homogeneizados con 1 mL de TRIzol aplicando 5 a 10 pulsos de ultrasonido por 10 segundos de duración con un sonicador ajustado a 70% de amplitud (SONICS, Vibra Cell). El homogenizado se centrifugó a 12.000xg por 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido, fue incubado por 5 min a temperatura ambiente y seguidamente se agregó 200 µL de cloroformo por cada 1 mL de homogenizado, se agitó por inversión y luego de 10 min a 4°C la mezcla fue centrifugada a 13.000xg por 15 min a 4°C, obteniéndose una fase orgánica (inferior) que contiene las proteínas, una interfase que contiene el ADN y una fase acuosa (superior) que contiene el ARN. La fase acuosa fue cuidadosamente aspirada y se le agregó un volumen equivalente de isopropanol. Se incubó por 12-16 hrs a -20°C para precipitar el ARN. Después de una centrifugación a 13.000xg por 15 min a 4°C, el sedimento fue lavado con etanol al 75% y resuspendido en 20 µL de agua libre de RNasas. El



ARN total fue cuantificado por espectrofotometría (SmartSpec 300, Bio-Rad) midiendo la absorbancia (Abs) a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ARN se evaluó midiendo la Abs a una longitud de onda de 280 nm y se calculó la relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$ , la que fluctuó entre 1,6 y 2,0.

#### **2.4.2. Reacción de transcripción reversa**

Para eliminar posible ADN contaminante, 1  $\mu$ g de ARN total fue sometido a digestión con DNasa I por 3 hrs a 37°C en tampón 10 mM TrisHCl pH 7,5; 2,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,1 mM  $CaCl_2$ . La reacción fue detenida con EDTA 25 mM y denaturación enzimática a 65°C por 15 min. Para la síntesis de ADNc se realizó transcripción reversa a partir del ARN total digerido con DNasa I. Se incubó con 5  $\mu$ M Oligo dT (NEB); 0,5 mM dNTPs; 20 U de inhibidor de RNasas y 160 U de transcriptasa reversa en un tampón de transcripción reversa (0,5 M Tris-HCl pH 8,3; 0,75 M KCl; 0,03 M  $MgCl_2$ ). La mezcla de transcripción reversa fue incubada por 1 hr a 42°C. Paralelamente, se realizaron mezclas en ausencia de transcriptasa reversa para controlar la presencia de ADN genómico contaminante.

#### **2.4.3. PCR utilizando KAPA Taq polimerasa**

Para analizar la expresión de SVCT2 por RT-PCR, se amplificó una secuencia del ADN de interés utilizando la enzima ADN polimerasa termoestable KAPA Taq DNA polimerasa. Se mezcló una alícuota de ADNc con buffer A de KAPA Taq polimerasa 10X ( $MgCl_2$  1X 1,5 mM); 0,2 mM dNTPs; 0,400  $\mu$ M de partidor sentido; 0,400  $\mu$ M de partidor antisentido y 0,35 U de KAPA Taq DNA polimerasa. La mezcla de PCR fue incubada por 2 min a 95°C para lograr una denaturación inicial. Luego, las muestras fueron sometidas a 35 ciclos sucesivos de 95°C por 30 seg, 58-60°C por 30 seg para hibridación de los partidores para SVCT2 y  $\beta$ -actina de pollo, respectivamente y 72°C por 30 seg para la elongación del ADN. Finalmente, se incluyó un paso terminal de elongación a 72°C por 2 min. Los partidores fueron diseñados basados en la secuencia predicha de SVCT2 de pollo (589 bp) y de  $\beta$ -actina de pollo (282 bp) (Tabla 1). Como control se amplificó con partidores específicos un fragmento del ARN de  $\beta$ -actina de pollo.

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en buffer TAE 1X y visualizados exponiendo el gel a luz UV en un transiluminador.

## **2.5. PCR tiempo real (qPCR)**

Los ensayos de qPCR fueron desarrollados utilizando un termociclador Stratagen Mx3000p Agilent®. Para la mezcla de reacción se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  ADNc, 10  $\mu\text{L}$  de 2x SYBR Green QPCR master mix, 1  $\mu\text{L}$  de primer sense 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  de primer antisense 10  $\mu\text{M}$  completando con agua para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . La detección de los genes de interés fue realizada utilizando los partidores señalados en la tabla 2. Como control de la reacción fue amplificada  $\beta$ -actina de ratón. La mezcla de qPCR fue incubada por 3 min a 95° C y 50 ciclos sucesivos de 95°C por 10 seg para la denaturación, 60°C por 20 seg para para hibridación de los partidores. Finalmente, las muestras fueron incubadas a 95°C por 1 min, 55°C por 30 seg y 95°C por 30 seg.

### **2.5.1. Cuantificación por PCR en tiempo real**

La cuantificación se realizó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación al número de ciclos requeridos para amplificar un gen de referencia sobre su umbral. Como gen de referencia se comparó la expresión de  $\beta$ -actina. Los resultados fueron expresados aplicando el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ s en los cuales la cantidad de ARN fue expresado como veces sobre el control.

## **2.6. Extractos de proteínas musculares**

### **2.6.1. Extractos de proteínas totales**

Se extrajeron proteínas totales desde músculo de pollo, cerebro de pollo y de cultivos celulares. Las muestras se homogenizaron con 5 pulsos de 10 seg a 70% de potencia en el sonicador Vibra cell (Sonics) en el caso de los tejidos y con una jeringa de 1 mL en el caso de las células, en una solución de sacarosa 0,3 M que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas. El homogenizado fue

centrifugado a 6.000xg por 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido corresponde al extracto de proteínas totales.

### **2.6.2. Obtención de extractos enriquecidos en proteínas citosólicas y de membrana**

Con el objetivo de evaluar la expresión de SVCT2 en diferentes fracciones celulares, se extrajo proteínas de forma secuencial, para enriquecer fracciones en proteínas solubles y asociadas a membrana de cultivos primarios. Después de lavar las células adheridas a placas de 60 mm de diámetro 3 veces con PBS, se agregó 400  $\mu$ L de PBS (extracto PBS) con inhibidores de proteasas. Posteriormente, las células se rasparon y se homogenizó con jeringa de 1 mL. El homogeneizado fue centrifugado a 12.000xg por 10 minutos a 4°C obteniéndose en el sobrenadante una fracción enriquecida en proteínas citosólicas. El sedimento obtenido en el paso anterior fue resuspendido en buffer 50 mM Tris HCl pH 7,4; 0,5% v/v Tritón X-100 y 0,15 M NaCl (extracto TX) usando jeringa de 1 mL y centrifugando a 12.000xg por 10 minutos a 4°C obteniéndose en el sobrenadante una fracción enriquecida en proteínas de membrana celular. Finalmente el sedimento obtenido en el paso anterior fue resuspendido en buffer 50 mM Tris HCl pH 7,4; 0,5% v/v Tritón X-100 y 0,5 M KCl (extracto TX-KCl) usando jeringa de 1 mL.

### **2.7. Cuantificación de proteínas**

Para determinar la concentración en cada extracto las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para la construcción de una curva de calibración, se prepararon 6 soluciones de distintas concentraciones de BSA (0, 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu$ g/mL) con reactivo de Bradford diluido 5 veces. Las muestras de proteínas fueron diluidas en un volumen final de 1 mL que contenía 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia, a una longitud de onda de 595 nm en espectrofotómetro. La concentración de las muestras se determinó interpolando en la curva de calibración.

## **2.8. Western blot**

### **2.8.1. Electroforesis de proteínas**

Para separar las proteínas de cada muestra, entre 10-30  $\mu\text{g}$  (células y fracciones de músculo esquelético) y 80  $\mu\text{g}$  (tejido) de proteínas totales fueron diluidas en buffer de carga 1X y denaturadas a 95°C por 5 minutos. Las muestras se sembraron en geles de acrilamida/bisacrilamida 30%, compuesto por un gel separador de proteínas en la parte inferior (acrilamida/bisacrilamida al 10% p/v) y un gel concentrador (acrilamida/bisacrilamida al 5%) en la parte superior. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara con buffer de electroforesis aplicando un voltaje constante de 150 V.

### **2.8.2. Transferencia a membrana PVDF Immobilon**

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de PVDF. Para la transferencia, el gel se dispuso sobre la membrana de PVDF y estos dos entre láminas de papel filtro, los cuales fueron fijados con una abrazadera y se introdujeron dentro de una cámara con buffer de transferencia. Para permitir el traspaso de las proteínas desde el gel a la membrana, se aplicó una corriente eléctrica constante de 350 mA por 90 minutos. Posteriormente el grado de transferencia se evaluó tiñendo la membrana con Rojo Ponceau S, colorante que se une rápida y reversiblemente a las proteínas.

### **2.8.3. Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado**

La membrana de PVDF fue bloqueada con tampón TBS Tween 20 (72,3 mM NaCl; 20,7 mM Tris pH 7,4; 0,1% v/v Tween 20) y 5% leche descremada por 1 hora con agitación y posteriormente fue incubada con anticuerpo primario (Tabla 3) diluido en buffer de bloqueo por 16 horas a 4°C. Después de 8 lavados por 5 minutos cada uno con tampón TBS Tween 20 y 5 lavados con TBS Tween 20 y leche descremada 5% (para SVCT2) y 5 lavados con buffer TBS Tween 20 (para los demás anticuerpos), la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (Tabla 4) diluido en buffer de bloqueo por 2 horas a temperatura ambiente. La actividad de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) conjugada al anticuerpo

secundario fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus. El sustrato de la enzima,  $H_2O_2$ , se mezcló en igual proporción con el reactivo luminol y esta mezcla fue esparcida en la membrana de nitrocelulosa para gatillar la reacción quimioluminiscente. La película autorradiográfica fue expuesta por 3-10 minutos a la reacción enzimática superponiéndola a la membrana. La señal en la película autorradiográfica fue revelada en solución de revelado y posteriormente fue fijada en solución fijadora. En algunos casos la membrana fue lavada e incubada a 60 °C con solución de stripping para ser reincubada con otro anticuerpo.

#### **2.8.4. Cuantificación de la intensidad de bandas**

Para cuantificar los niveles de expresión del ARN, se normalizaron en relación a la expresión de su control en los ensayos de RT-PCR. Las imágenes fueron obtenidas por digitalización y convertidas a escala de grises. Con el programa *Image J* (NIH), se seleccionaron las zonas que contenían las bandas y se cuantificó el área bajo la curva de los máximos de intensidad. Los valores fueron expresados como la relación de la intensidad de las bandas de SVCT2/ $\beta$ -actina.

#### **2.9. Inmunohistoquímica**

Para estudiar la localización de SVCT2 en fibras musculares se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en criosecciones de tejido muscular de pollo adulto y humano. El tejido disecado fue congelado en medio OCT sumergiéndolo en isopentano enfriado por nitrógeno líquido, método que preserva las propiedades histoquímicas del músculo (Wu y cols., 1985). El taco obtenido fue seccionado utilizando un crióstato (Microm HM520) generando cortes de 20  $\mu$ m de espesor. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos previamente tratados con Vectabond y posteriormente fijados en metanol 100% a -20°C por 10 min. Las criosecciones fueron lavados con PBS-tween 0,05% y bloqueadas con BSA 1% por 2 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y de distintos marcadores de músculo esquelético

diluido en tampón Tris-fosfato BSA 1% por 12-16 hrs a 4°C (Tabla 3) y revelado con un anticuerpo secundario anti IgG de cabra conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 o anti IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 546 diluido en tampón Tris fosfato BSA 1% por 2 hrs a temperatura ambiente (Tabla 4). Paralelamente, para analizar posibles señales inespecíficas del anticuerpo secundario, en cortes seriados de músculos de pollo el anticuerpo primario fue omitido y sólo se incubó con solución de bloqueo. Las muestras se montaron con medio acuoso para fluorescencia, para su posterior visualización en un microscopio confocal (microscopio Nikon, modelo Eclipse TE2000-U)

### **2.10. Inmunocitoquímica**

Se evaluó la expresión de SVCT2 *in vitro* en cultivo primario de miotubos de pollo, a través de inmunocitoquímica. Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos discoidales tratadas con HCl y gelatina 0,5% p/v para aumentar la adhesión celular en placas de 35 mm. Las células fueron fijadas en metanol 100% por 5 minutos a 4°C y permeabilizadas con PBS Tritón x-100 0,1% v/v. La inmunodetección de SVCT2 y marcadores musculares fue realizada con la incubación de un anticuerpo primario (Tabla 4) por 12-16 hrs a 4°C y reveladas con un anticuerpo secundario anti IgG de cabra conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 o anti IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 546 diluido en tampón Tris-fosfato BSA 1% por 2 hrs a temperatura ambiente (Tabla 4). Adicionalmente, fue utilizado ToPro-3 para la tinción de los núcleos celulares. Después de lavar con PBS, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio con medio de montaje para fluorescencia y secados a temperatura ambiente.

### **2.11. Histoquímica**

La determinación de la actividad mATPasa (Brooke y Kaiser, 1969; Dubowitz y Brooke, 1973) y NADH-TR (NADH-tetrazolium reductasa) (Dubowitz y Brooke, 1973) fue realizada en los músculos de pollo en los estadios post-natal y adulto utilizando criosecciones transversales de 20 µm de espesor que no fueron

crioprotectadas o fijadas para minimizar posibles artefactos en las reacciones histoquímicas.

### **2.11.1. ATPasa miofibrilar (mATPasa)**

Las criosecciones fueron preincubadas en tampón acetato de sodio (0,1 M acetato de sodio; 10 mM EDTA; pH 4.6) por 10 min y lavadas con agua. Luego fueron incubadas en solución de ATP (0,05% p/v ATP; 0,1 M Glicina; 0,75 M  $\text{CaCl}_2$ ; pH 9.6) por 10 min a 37°C y lavadas en agua. Posteriormente inmersas en solución  $\text{CaCl}_2$  al 2% p/v por 5 min y lavadas en agua. Finalmente inmersas en solución de sulfito de amonio y agua destilada en una dilución 1:20 v/v, lavadas en agua destilada y montadas en medio de montaje acuoso.

### **2.11.2. NADH-TR**

Las criosecciones fueron incubadas con solución NADH reducido (Tris 1X H 7,4; NADH reducido; NBET, nitro blue tetrazolium) por 45 min y posteriormente lavadas en solución de acetona (30, 60, 90, 60 y 30% v/v) por 5 min cada uno. Finalmente fueron lavadas en agua destilada y montadas con medio de montaje acuoso.

## **2.12. Determinación del área de sección transversal (CSA) de las fibras musculares**

El análisis histomorfométrico, fue realizado en criosecciones transversales de los músculos  $\text{LDA}_L$  y  $\text{LDP}_R$  en los cuales fueron determinadas previamente la actividad NADH-TR. Se analizaron como mínimo 100 fibras de tipo I y II de regiones seleccionadas al azar y sin alteraciones artefactuales. Las mediciones fueron calculadas usando el programa *Image J* y expresadas como  $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$ .

### **2.13. Tratamiento de cubreobjetos con HCl**

Para aumentar la adhesión de los mioblastos de pollo a los cubreobjetos de vidrio, donde fueron sembrados para experimentos de inmunocitoquímica, los cubreobjetos fueron sumergidos en HCl 10 M por 16 hrs a temperatura ambiente.



Posteriormente, fueron lavados 10 veces con agua destilada y se mantuvieron en etanol 96% v/v hasta su uso.

## **2.14. Adquisición de imágenes**

Las imágenes (1024 x 1024 bits) fueron obtenidas en un microscopio confocal Eclipse TE200-U-C1 (Nikon), equipado con láseres de argón (488 nm) y de helio-neón (543 y 633 nm). El análisis de fluorescencia fue realizado con el programa EZC-1 (Nikon).

## **2.15. Fraccionamiento de músculo esquelético de pollo adulto**

### **2.15.1. Fraccionamiento fuerza iónica-detergente**

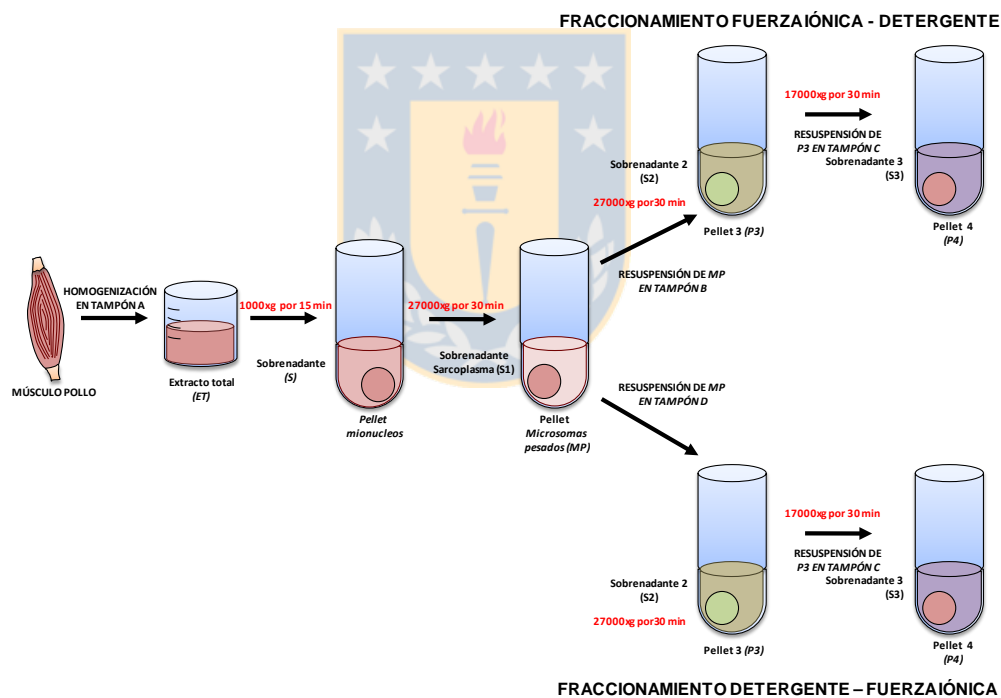
Gallinas adultas fueron eutanasiadas por dislocación cervical y los músculos LDA<sub>L</sub> y MA<sub>L</sub> (30 grs) fueron extraídos y mantenidos en tampón A (25 mM Tris HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA y 1 mM PMSF) a 4°C hasta su procesamiento. Los músculos fueron pesados y homogenizados en tampón A (10 volúmenes/masa músculo). El homogenizado (extracto total, ET) fue centrifugado a 1.000xg por 15 minutos (rotor Sorvall SS-34). El sobrenadante (S) obtenido, fue filtrado en gasa estéril y centrifugado a 27.000xg por 30 minutos, recuperándose un pellet de microsomas pesados (MP) y el sobrenadante (S1). Seguidamente, el MP fue resuspendido en tampón B (25 mM Tris HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA y 1 mM PMSF) y centrifugado a 27.000xg por 30 minutos, obteniéndose un sobrenadante (S2) y el pellet (P3). Finalmente el P3, fue resuspendido en tampón C (25 mM Tris HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF y 0,5% TX-100) y centrifugado a 17.000xg por 30 minutos, obteniéndose el sobrenadante (S3) y un pellet final (P4) (Figura 2) (Brenman y cols., 1995).

### **2.15.2. Fraccionamiento detergente-fuerza iónica**

Gallinas adultas fueron eutanasiadas por dislocación cervical y los músculos LDA<sub>L</sub> y MA<sub>L</sub> (30 grs) fueron extraídos y mantenidos en tampón A (25 mM Tris HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA y 1 mM PMSF) a 4°C hasta su



procesamiento. Los músculos fueron pesados y homogenizados en tampón A (10 volúmenes/masa músculo). El homogenizado (extracto total, ET) fue centrifugado a 1.000xg por 15 minutos. El sobrenadante (S) obtenido, fue filtrado en gasa estéril y centrifugado a 27.000xg por 30 minutos, recuperándose un pellet de microsomas pesados (MP) y un sobrenadante (S1). Seguidamente, el MP fue resuspendido en tampón D (25 mM Tris HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF y 0,5% TX-100) y centrifugado a 27.000xg por 30 minutos, obteniéndose un sobrenadante (S2) y el pellet (P3). Finalmente el P3, fue resuspendido en tampón C (25 mM Tris HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF y 0,5% TX-100) y centrifugado a 17.000xg por 30 minutos, obteniéndose el sobrenadante (S3) y un pellet final (P4) (Figura 2).



**Figura 2: Representación esquemática del fraccionamiento de músculo esquelético adulto.**

Extracto total (ET), sobrenadante (S), sobrenadante sarcoplasma (S1), microsomas pesados (MP), sobrenadante 2 (S2), pellet 3 (P3), sobrenadante 3 (S3) y pellet 4 (P4).

## 2.16. Estadística

Los datos cuantitativos se presentan expresados como la media  $\pm$  SEM. SEM corresponde al error estándar de la media y se calcula como:

$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$  donde, SD: desviación estándar y n: número de observaciones.

Para evaluar la significancia estadística se utilizó el test estadístico *t* de Student no apareado con corrección de Welch, es decir no se asume igualdad de varianza entre los grupos analizados. Este test fue elegido porque los datos poseen una variable nominal con sólo dos valores: control o experimental y una sola variable medible (expresión de SVCT2). La hipótesis nula indica que la variable medible es igual para las dos categorías de datos. Este análisis se realizó utilizando el programa *GraphPad Prisma v5.0*. Un valor  $p > 0,05$  fue considerado estadísticamente no significativo (ns), y a los valores  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  y  $p < 0,0001$  se les asignó significancias estadísticas crecientes (\*; \*\* y \*\*\*, respectivamente). Para  $p < 0,05$  se rechaza la hipótesis nula.



## V. RESULTADOS

En las fibras musculares como consecuencia de la actividad física normal se generan especies oxidativas, que en condiciones de ejercicio intenso pueden producir daños a nivel tisular. Sin embargo, se ha demostrado que bajos niveles de especies oxidantes están involucrados en la regulación de la actividad contráctil y en la expresión génica en las fibras musculares. En respuesta a estas moléculas oxidantes, las fibras han desarrollado diversos mecanismos que contrarrestan su potencial efecto nocivo. Como parte de estos mecanismos, la vitamina C actuaría como un potente antioxidante regulando la generación excesiva de agentes oxidantes o disminuyendo su actividad.

Se ha reportado que la disponibilidad de vitamina C en distintos tipos celulares está directamente relacionada a la expresión de los co-transportadores de sodio-ascorbato, SVCTs. En este contexto, estudios realizados en nuestro laboratorio y como parte de esta tesis han permitido determinar la expresión de SVCT2 en el tejido muscular y que este se restringe específicamente a las fibras musculares lentas oxidativas en pollo durante la miogénesis temprana y en mamíferos e incluso de humano durante la etapa adulta.

Las fibras pueden modificar su fenotipo alterando su patrón de expresión génica como respuesta a factores extrínsecos desde uno rápido a lento y viceversa. De forma interesante, se ha determinado que en el transcurso del desarrollo post-natal las fibras musculares adquieren sus principales características metabólicas como parte del proceso adaptativo frente a la actividad física. En este contexto, nosotros proponemos que la regulación de los niveles de vitamina C por SVCT2 permitiría inducir y/o mantener el fenotipo lento en las fibras musculares.

Con el propósito de analizar los niveles de SVCT2 en las fibras musculares, nosotros realizamos la *“determinación de la expresión de SVCT2 en músculos esqueléticos de pollo durante la etapa post-natal”*. Para ello nuestra primera aproximación experimental fue la determinación de la expresión del transportador a nivel de transcrito y proteína en los músculos de pollos adultos.

## 1. Expresión de SVCT2 en músculo esquelético de pollo adulto

Con el propósito de analizar la expresión de SVCT2 en músculos esqueléticos de pollo adulto y compararlo con lo observado durante la miogénesis embrionaria, se realizaron ensayos de RT-PCR a partir de ARN total de los músculos lento *Latissimus dorsi anterior* (LDA<sub>L</sub>) y rápido *Latissimus dorsi posterior* (LDP<sub>R</sub>). Como control positivo para SVCT2 se utilizó ARN total de cerebro de embrión de pollo (HH45) el cual ha sido documentado previamente por presentar altos niveles de expresión del transportador (Low y cols., 2009). Como control negativo, se realizaron reacciones en ausencia de transcriptasa reversa, donde no se observa amplificación de producto y como control interno se amplificó  $\beta$ -actina de pollo (282 bp). Sólo en las muestras de cerebro y LDA<sub>L</sub> analizados, se detectó la expresión de un transcrito de 589 bp correspondiente a SVCT2 de pollo (Figura 3A)

Para analizar la expresión de la proteína SVCT2 en la etapa adulta, se realizaron ensayos de Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce una secuencia específica en la región N-terminal de SVCT2 de rata. Los extractos totales de proteínas de los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> fueron separados en un gel de acrilamida/bisacrilamida 10% p/v y transferidos a una membrana PVDF y posteriormente incubados con el anticuerpo anti SVCT2. Como control positivo, se utilizaron extractos de proteínas totales provenientes de cerebro de embrión de pollo (HH45). De manera similar a los ensayos de RT-PCR, se detectó una banda inmunorreactiva para SVCT2 de 65 KDa en el músculo LDA<sub>L</sub>, al igual que en la muestra de cerebro. Adicionalmente a la banda antes descrita, se detectó inmunoreactividad para SVCT2 en bandas de 180, 95 y 53 KDa (Figura 3B). Con el propósito de igualar la carga entre los carriles y que los resultados obtenidos no sean producto de variaciones en la cantidad de proteína total, se realizó la tinción con Azul de Coomassie de un gel de acrilamida/bisacrilamida 10% p/v utilizando las muestras de cerebro, LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub>. Los resultados obtenidos señalan que efectivamente las muestras fueron cargadas con una concentración comparable. Sin embargo, la tinción de las bandas en el gel denota un perfil de migración electroforético diferencial entre los 2 tipos de músculos de pollo y cerebro (Figura

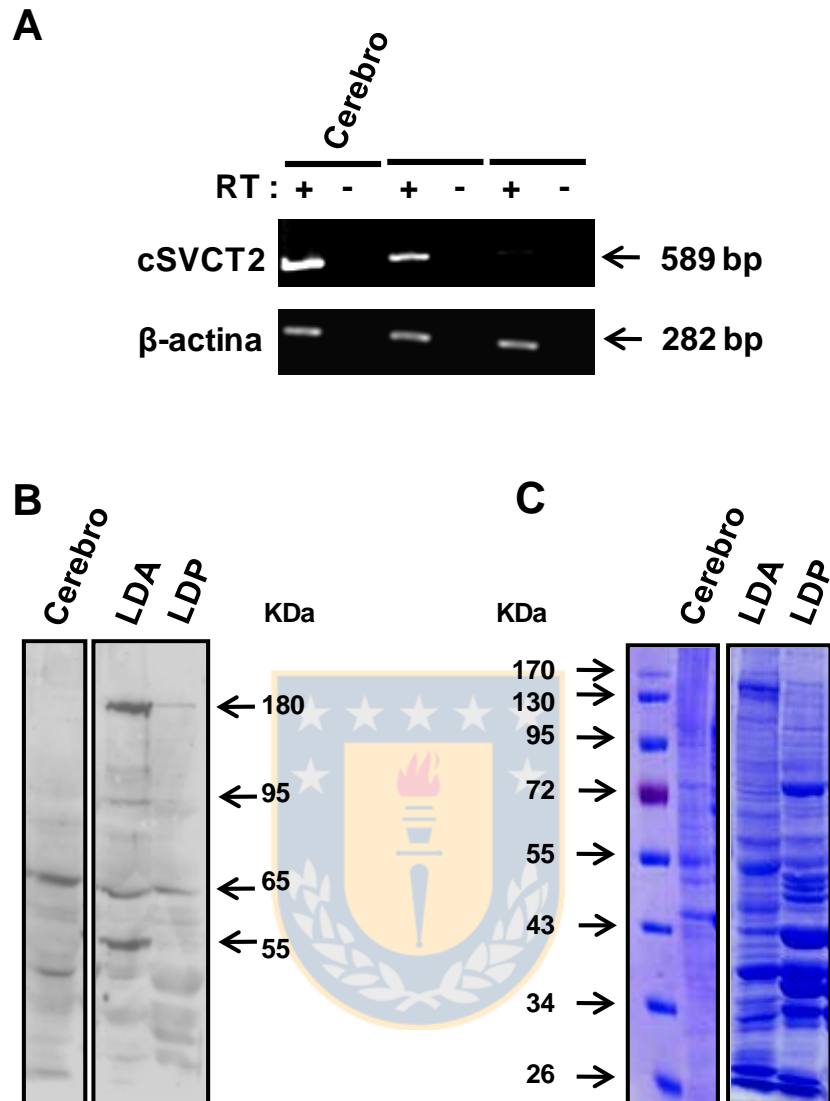
2C). En el músculo rápido  $LDP_R$ , a diferencia de lo observado en el músculo lento  $LDA$  se identificaron 5 bandas con mayor intensidad de masas moleculares aproximadas de 72, 43 y 34 KDa (Figura 3C).

Los resultados por RT-PCR y Western blot concuerdan con los obtenidos durante los estadios tardíos en la miogénesis embrionaria de pollo, los cuales sugieren la expresión de SVCT2 en fibras lentas, así como la existencia de distintas formas del transportador durante esta etapa del desarrollo y en el transcurso de la etapa post-natal hasta la adultez.

### **1.1. Distribución de SVCT2 en el músculo esquelético de pollo adulto.**

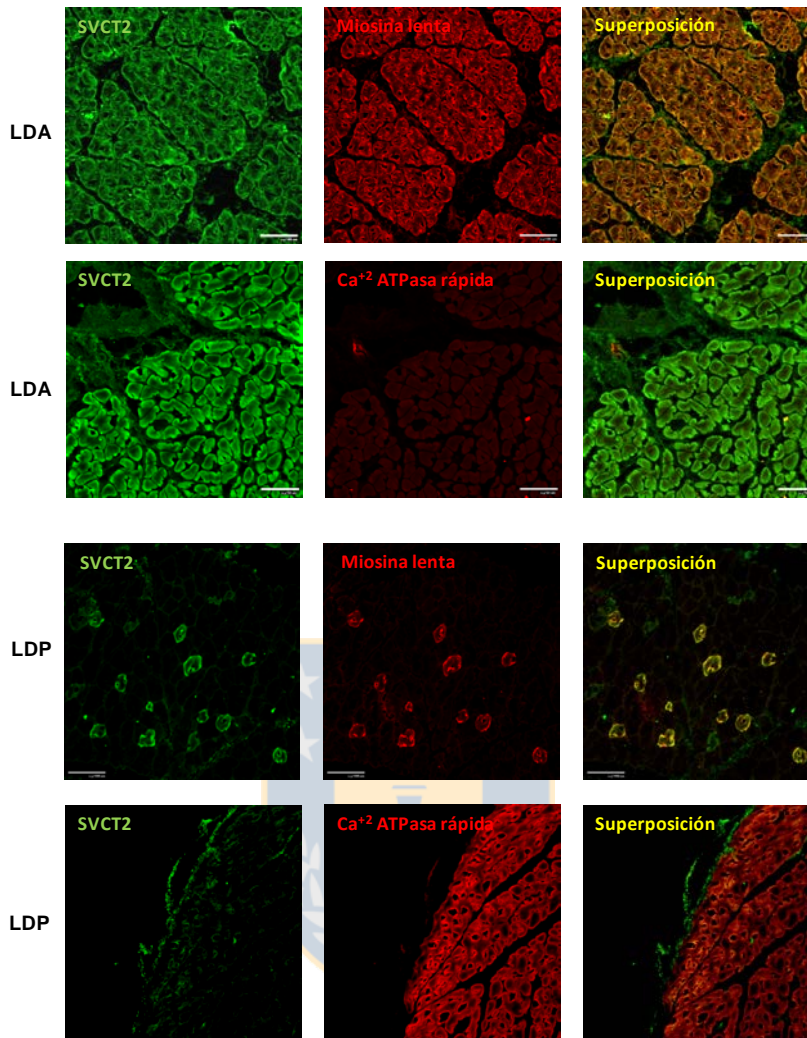
Con el fin de describir la distribución de SVCT2 de pollo en las fibras musculares de pollo adulto, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en los músculos  $LDA_L$  y  $LDP_R$ . Debido a las características anatómicas e histológicas del tejido muscular, se procedió en primer lugar a estandarizar las condiciones para su procesamiento (Anexo 1). Para este motivo, se utilizó el congelamiento de los músculos por nitrógeno líquido en matriz OCT y se estandarizó la obtención de criosecciones de 20  $\mu\text{m}$  de espesor que permitiesen mantener la integridad histológica. De esta manera se minimizaron las posibles alteraciones en la forma de las fibras y de los fascículos musculares y su relación con el tejido conectivo circundante que pudiese inducir a errores en la interpretación de los resultados.

Las criosecciones transversales de los músculos  $LDA_L$  y  $LDP_R$  adultos fueron incubadas con el anticuerpo anti SVCT2 y paralelamente se incubaron con anticuerpos anti miosina lenta y anti  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa rápida (SERCA1), con el fin de discriminar la presencia de fibras lentas y rápidas respectivamente (Figura 4). Los resultados indican un patrón de inmunorreactividad intracelular para SVCT2 en la totalidad de las fibras del músculo  $LDA_L$ . De igual forma, las fibras positivas para SVCT2 presentan inmunorreactividad para miosina lenta, lo que demuestra la expresión preferencial de SVCT2 en fibras tipo I lentas oxidativas en este músculo. A diferencia de lo observado para SVCT2 y miosina lenta, no existe colocalización en la inmunorreactividad entre SVCT2 y  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa rápida, demostrando la



**Figura. 3. Expresión de SVCT2 en músculo esquelético de pollo adulto.**

**A.** Expresión del ARNm de SVCT2 en músculo esquelético de pollo adulto. Se extrajo RNA total de los músculos esqueléticos *Latissimus dorsi anterior* (LDA<sub>L</sub>) y *Latissimus dorsi posterior* (LDP<sub>R</sub>) de pollos adultos, los cuales fueron transcritos a cDNA con transcriptasa reversa (RT+). Como control, la misma reacción fue realizada en ausencia de la enzima (RT-). Como control positivo se utilizó RNA total de cerebro de pollo embrionario (E18). Como control de carga se amplificó β-actina. **B.** Análisis de expresión de SVCT2 por Western blot en extractos proteicos totales (80 μg) de tejido muscular de LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub>. **C.** Como control de carga, se muestra la migración electroforética de las proteínas en las muestras de cerebro, LDA<sub>L</sub>, LDP<sub>R</sub> teñidas con Azul de Coomassie. Las flechas indican las masas relativas correspondientes al patrón de migración electroforética. (n=3).



**Figura 4. SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo adulto.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones de músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub>. Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) (*panel izquierdo*). Adicionalmente, las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti miosina lenta y revelado con un anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo) (*panel LDA y LDP central superior*). Imágenes de colocalización de SVCT2 y miosina lenta (*panel LDA y LDP derecho superior*). Paralelamente, las criosecciones fueron incubadas con anticuerpo primario anti Ca<sup>2+</sup> ATPasa rápida (SERCA 1) y revelado con un anticuerpo anti-IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo) (*panel LDA y LDP central inferior*). Imágenes de colocalización de SVCT2 y Ca<sup>2+</sup> ATPasa rápida (*panel LDA y LDP derecho inferior*). Barra 50 µm.



exclusión de este transportador en este tipo de músculo, en que son mayoritarias sus fibras rápidas. Sin embargo, las escasas fibras lentas presentes en  $LDP_R$  muestran reacción positiva para SVCT2 (Figura 4).

Nuestros resultados nos permiten concluir que la expresión de SVCT2 en el tejido adulto presenta el mismo patrón que durante el período embrionario. Sin embargo, debido a que el fenotipo muscular es definido tempranamente por la adquisición de sus principales características metabólicas durante la etapa post-natal temprana, nosotros analizamos la expresión de SVCT2 durante este período del desarrollo.

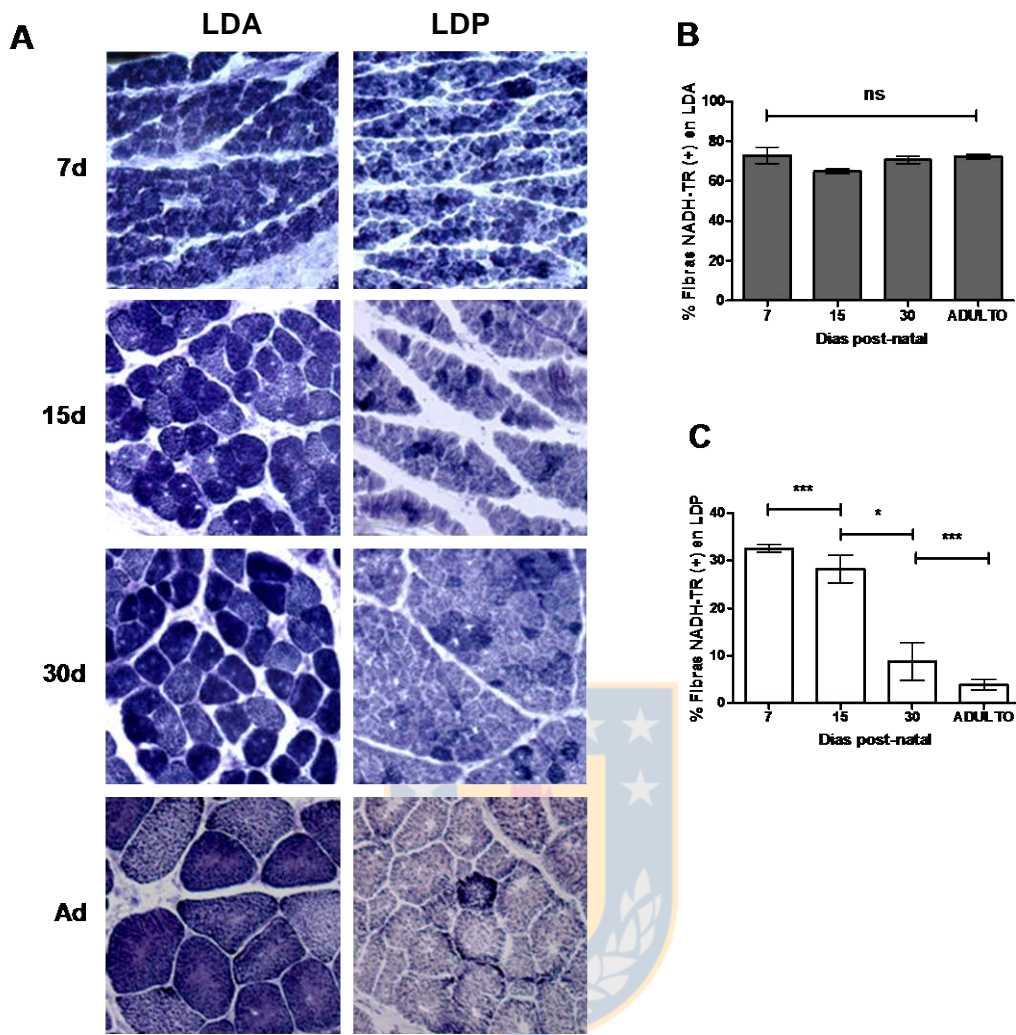
## **1.2. Caracterización de las fibras musculares esqueléticas de pollo durante la etapa post-natal**

### **1.2.1. Caracterización morfológica y metabólica de fibras musculares de pollo**

Con el propósito de evaluar la expresión de SVCT2 en el músculo esquelético en la etapa post-natal y cómo esta podría estar influenciada por el contexto fisiológico de los músculos en esta etapa, se procedió a realizar una caracterización morfológica de las fibras musculares de pollo en los músculos  $LDA_L$  y  $LDP_R$ , considerando el área de sección transversal de las fibras y la determinación de la actividad metabólica de la NADH-TR (NADH tiorreductasa) (Figura 5 y 6) y la actividad ATPasa miofibrilar (mATPasa) (Figura 7)

Los resultados obtenidos en los ensayos de NADH-TR indican que la composición histológica de los músculos es distinta entre los músculos analizados desde la etapa post-natal temprana (7 días) hasta la adultez, debido a la presencia mayoritaria de fibras lentas oxidativas NADH-TR positivas (tinción azul oscuro) en el músculo  $LDA_L$  en comparación con  $LDP_R$  (Figura 5A). La cuantificación de la población de fibras NADH-TR positivas en  $LDA_L$ , indican que la abundancia porcentual de estas fibras se mantiene sin variaciones ( $p > 0,05$ ) en un 70% aproximadamente (Figura 5B). Contrariamente a lo observado en  $LDA_L$ , la población de fibras NADH-TR positivas en  $LDP_R$  disminuye significativamente a partir de los 7 días post-natal hasta la adultez desde un 38% a 3,5% respectivamente (Figura 5C).





**Figura 5. Determinación de la actividad NADH-TR en los músculos esqueléticos de pollo durante el desarrollo post-natal.**

**A.** Composición histológica de los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> a los 7, 15, 30 días y adulto. La reacción NADH-TR en las criosecciones permite identificar las fibras lentas oxidativas tipo I (tinción azul oscuro) y fibras rápidas glicolíticas tipo II (tinción azul claro). Barra 50  $\mu$ m. **B.** Población de fibras musculares esqueléticas lentas, expresada como porcentaje (%) en el músculo LDA<sub>L</sub> a los 7, 15, 30 días y adulta. **C.** Población de fibras musculares esqueléticas lentas NADH-TR+, expresado en porcentaje (%) en el músculo LDP<sub>R</sub> a los 7, 15, 30 días y adulto.

El análisis morfológico de las fibras musculares presentes en los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> revelaron un aumento progresivo del área transversal en las fibras musculares entre los 7 días post-natal y el estado adulto ( $p < 0,05$ ) (Figura 5A y 5B). En todos los estadios post-natales analizados el área de las fibras musculares NADH-TR positivas y negativas no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 6A y 6B), excepto durante el estadio adulto en el músculo LDP<sub>R</sub> (Figura 6B)

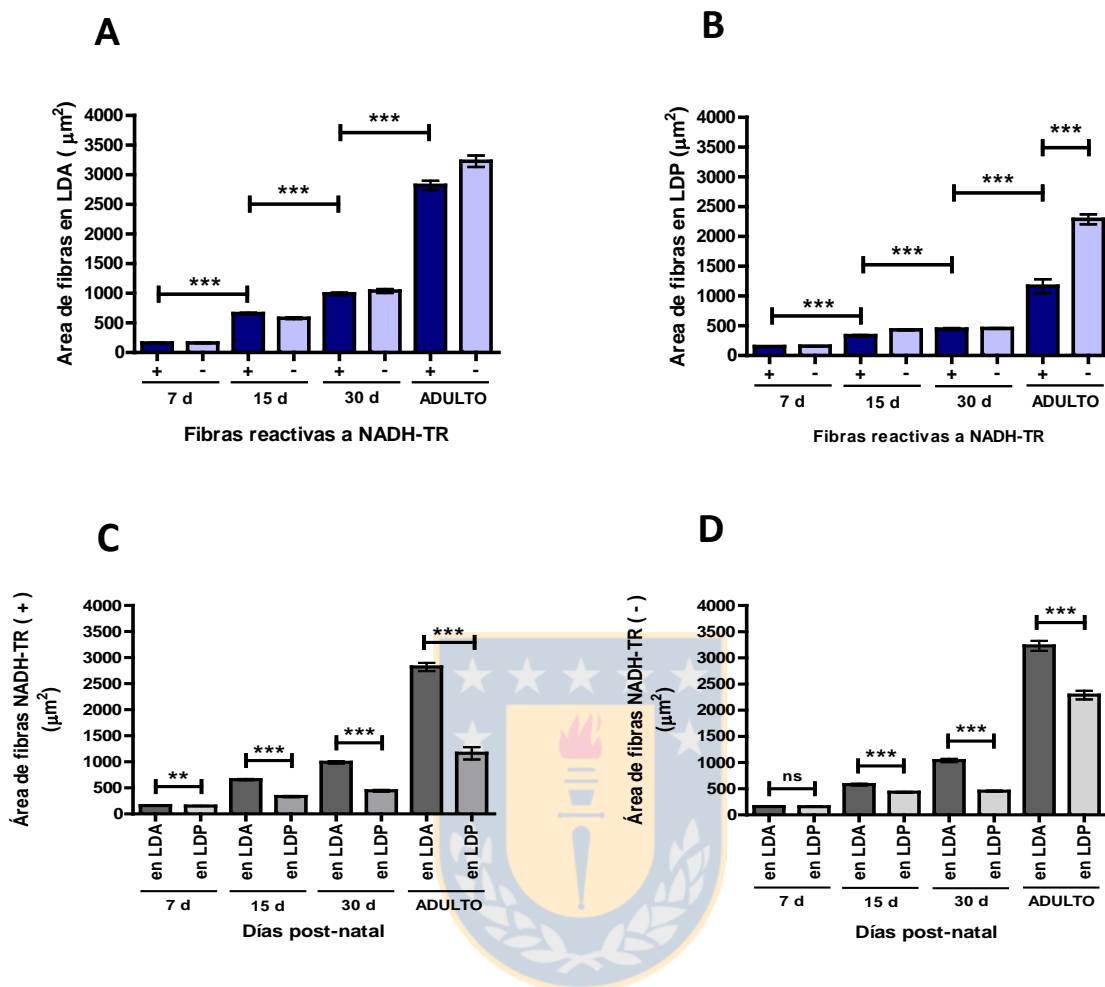
Por otra parte, el análisis morfológico comparativo del área de las fibras NADH-TR positivas en los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> señalan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en todos los estadios evaluados (Figura 5C). De forma similar a lo observado anteriormente, el área de las fibras NADH-TR negativas en los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), exceptuando al día 7 post-natal (Figura 6D)

Finalmente la existencia de los diferentes fenotipos fibrilares en los músculos de pollo adulto fue demostrada por la determinación de la actividad mATPasa (Figura 7). Las criosecciones transversales de LDA<sub>L</sub> mostraron una intensa tinción para mATPasa en la totalidad de sus fibras, demostrando que este músculo está compuesto solamente de fibras lentas. Por otra parte, el análisis del LDP<sub>R</sub> mostró que este músculo está constituido preferencialmente por fibras rápidas debido a la ausencia de tinción en la mayoría de sus fibras.

Considerando nuestros resultados, nosotros concluimos que durante el desarrollo post-natal en las fibras musculares se producen modificaciones morfológicas y metabólicas progresivas que determinan las características finales del músculo adulto.

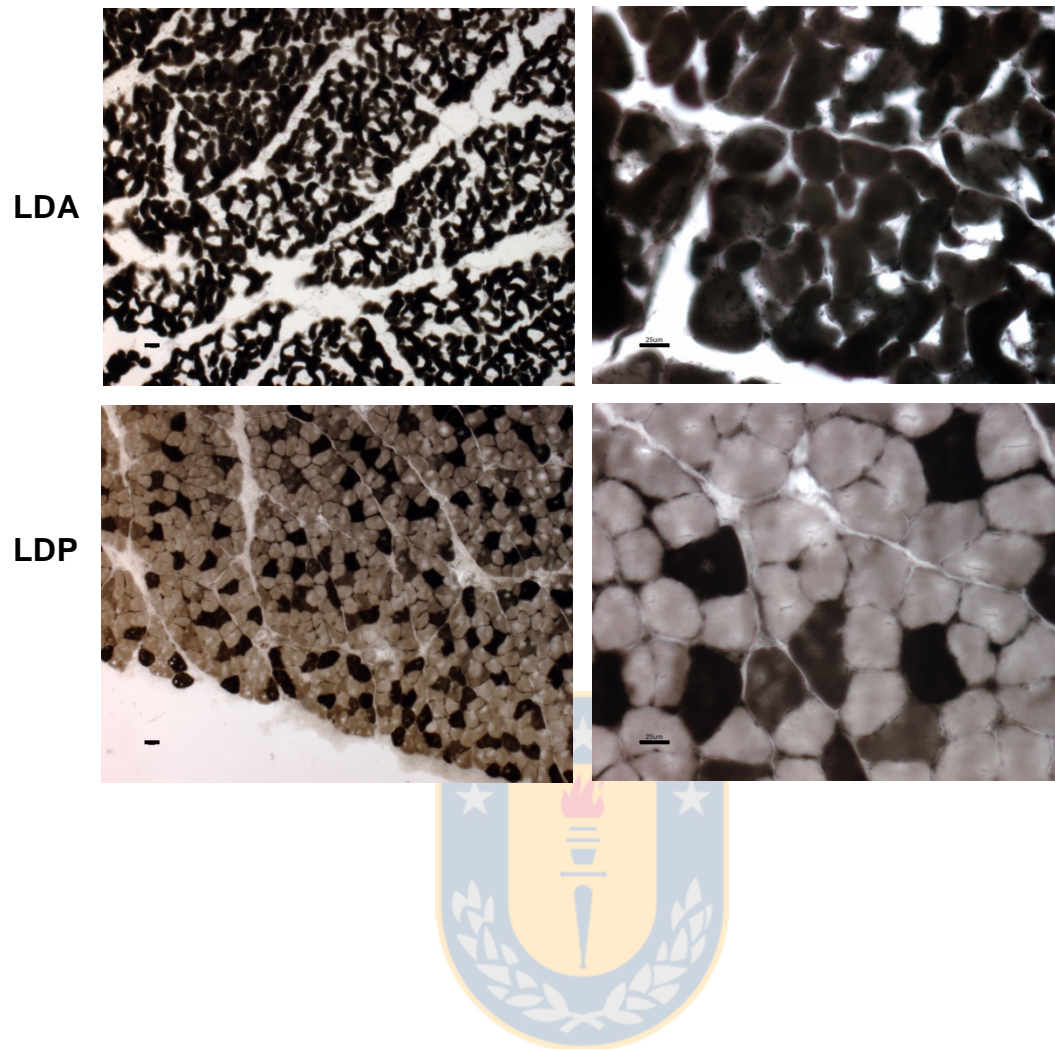
### **1.2.2. Caracterización molecular de las fibras musculares de pollo.**

De forma complementaria al análisis morfológico y metabólico de las fibras musculares, se procedió a caracterizar a los músculos desde el punto de vista de los marcadores moleculares específicos que definen el fenotipo de las fibras musculares. Primeramente, se realizó un perfil electroforético a partir de extractos



**Figura 6. Caracterización morfológica y metabólica de las fibras musculares esqueléticas de pollo durante la etapa post-natal.**

**A.** Área transversal de fibras musculares en LDA<sub>L</sub>, según reactividad a NADH-TR. **B.** Área transversal en fibras musculares en LDP<sub>R</sub>, según reactividad a NADH-TR. NADH-TR + (azul oscuro) y NADH-TR - (celeste). **C.** Área transversal de fibras musculares NADH-TR positivas (+) en los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub>. **D.** Área transversal de fibras musculares NADH-TR negativas (-) en los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub>.  $p < 0,005$ . Los resultados son expresados en área promedio ( $\mu\text{m}^2$ )  $\pm$  SEM.



**Figura 7. La determinación de la actividad mATPasa permite identificar los fenotipos lentos y rápidos en músculos esqueléticos de pollo adulto.**

Actividad ATPasa miofibrilar con pre-incubación a pH 4,6 de fibras musculares esqueléticas de pollo adulto en músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub>. Barra 50 μm (*panel izquierdo*). Barra 25 μm (*panel derecho*).

totales de proteínas de los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> de animales de 7, 15, 30 días y adulto las cuales fueron separadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10% p/v y teñidas con Azul de Coomassie (Figura 7A). Los resultados obtenidos indican que existen notables diferencias en cuanto a los patrones de migración electroforética de sus proteínas, observándose una definición de las bandas específicas para cada músculo entre los 7 días post-natal y el estado adulto (Figura 7A). Los perfiles de los músculos LDA<sub>L</sub> presentan, a partir de los 7 días, una banda de aproximadamente 45 KDa que se mantiene inalterable hasta la adultez. De forma similar, en los músculos LDP<sub>R</sub>, se observa una marcada expresión de proteínas con masa moleculares de 130, 80, 55, 45 y entre 30 y 34 KDa, que se mantienen en forma conservada durante el período postnatal (Figura 8A), lo que reafirma lo observado durante el estadio adulto (Figura 2C).

Estos resultados nos permiten concluir que en el transcurso de la etapa post-natal temprana (7 a 30 días post-natal) los músculos desarrollan progresivamente un patrón de expresión de sus proteínas constituyentes en extractos totales similar a lo observado en el músculo adulto.

La determinación de marcadores moleculares específicos del fenotipo muscular durante la etapa post-natal fue realizada por medio de ensayos de Western blot, utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra las isoformas lenta y rápida de la proteína C. Las proteínas de extractos totales de los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> de 7, 15, 30 días post-natal y adulto fueron separadas en un gel de acrilamida/bisacrilamida 10% p/v y transferidas a membrana PVDF e incubadas posteriormente con los anticuerpos antes señalados. Los resultados obtenidos indican que los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> expresan niveles de proteína C lenta (banda inmunorreactiva de 140 KDa) en forma similar a los 7 días post-natal. Sin embargo, entre los 15 días post-natal y la etapa adulta la expresión de la isoforma lenta se presenta en forma preferencial en el músculo LDA<sub>L</sub> (Figura 8B). Por otra parte, la expresión de la isoforma rápida de proteína C es detectable en forma preferencial en el músculo rápido LDP<sub>R</sub> (Figura 8C).

Nuestros análisis de los perfiles electroforéticos y la expresión de las distintas isoformas de la proteína C nos permite concluir que durante el desarrollo

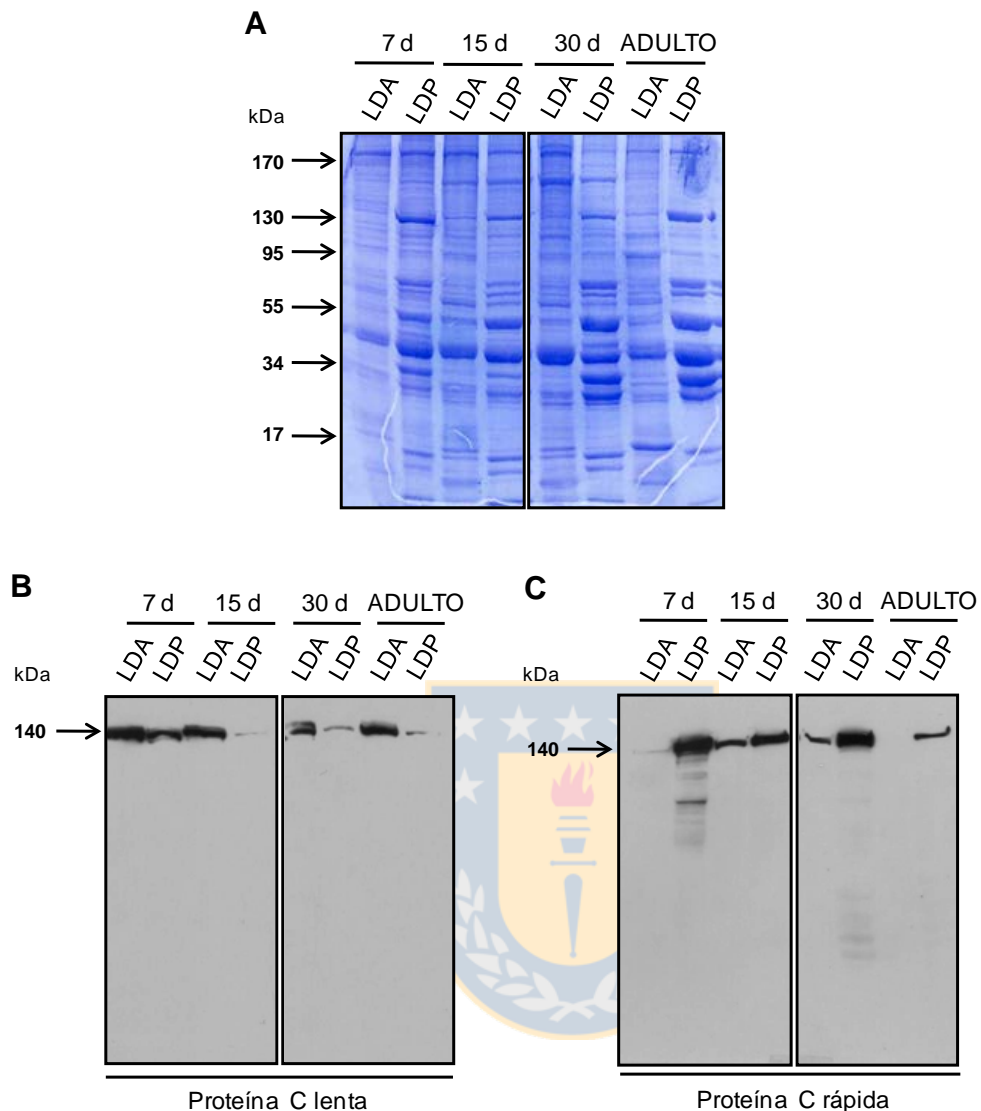


post-natal los músculos lentos y rápidos expresan un patrón diferencial de proteínas que son específicas para el fenotipo.

### **1.3. Expresión de SVCT2 en músculos esqueléticos de pollo.**

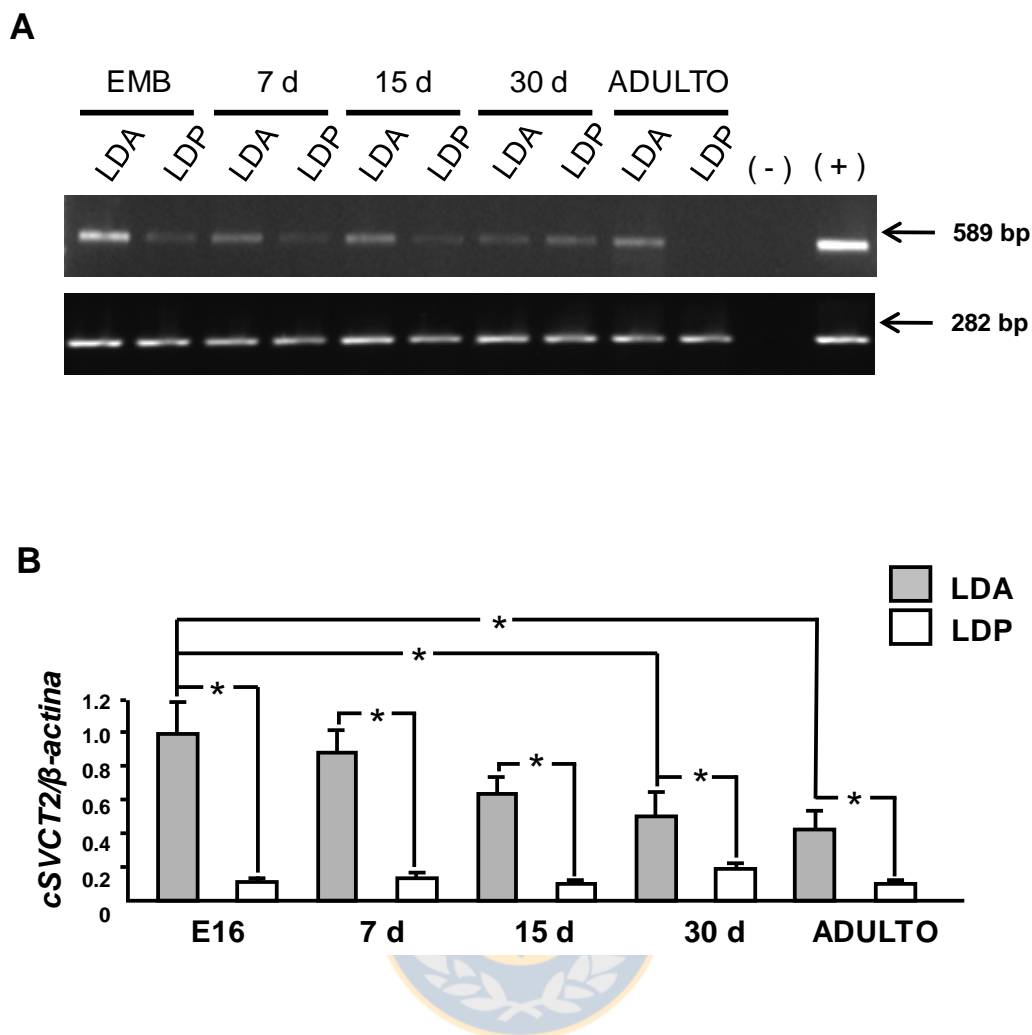
#### **1.3.1. Comportamiento temporal de la expresión de SVCT2 en músculos lentos y rápidos de pollo post-natal.**

Debido a que nuestros resultados indican que los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> adquieren características morfológicas, metabólicas y moleculares que permiten definir su fenotipo durante el período post-natal, nuestro siguiente paso fue correlacionar la expresión de SVCT2 con la naturaleza fenotípica de los músculos. Con este fin se realizaron ensayos semi-cuantitativos de RT-PCR utilizando ARN total de cerebro de embrión de pollo (HH45) y de los músculos LDA y LDP de los estadios embrionario (HH45) así como post-natal 7, 15, 30 días y adulto. Se utilizaron parejas de partidores internos para amplificar un fragmento específico de 589 bp en la región codificante del ARNm para SVCT2 de pollo. Como control interno, se amplificó  $\beta$ -actina de pollo (282 bp). Los resultados obtenidos indican la expresión preferencial de SVCT2 en los músculos LDA<sub>L</sub> en la etapa embrionaria tardía (HH45), 7, 15, 30 días post-natal y adulto respecto a los músculos LDP<sub>R</sub> (Figura 9A). En la Figura 9B se grafica la relación de intensidades relativas de los productos de PCR de SVCT2 y normalizados por los productos obtenidos por la amplificación de  $\beta$ -actina de pollo. Los resultados muestran que la expresión de SVCT2 en LDA<sub>L</sub> embrionario fue de alrededor de 8 veces más alta que en LDP<sub>R</sub> (Figura 9B). Durante la etapa post-natal temprana bajos niveles de expresión de SVCT2 fueron detectados en LDP<sub>R</sub> a diferencia de lo observado en LDA<sub>L</sub> (Figura 9B). Sin embargo, nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de SVCT2 en el músculo LDA<sub>L</sub> disminuyen progresivamente durante la etapa post-natal, observándose una reducción de aproximadamente un 50% de los niveles de expresión de SVCT2 a los 30 días y en el estado adulto comparado con lo observado en la etapa embrionaria tardía (Figura 9B). Aún cuando nuestros resultados referentes a la expresión temporal de SVCT2 señalaron que existe un



**Figura 8. Los músculos esqueléticos definen su fenotipo durante la etapa post-natal.**

**A.** Análisis de migración electroforética de extractos totales de proteínas (80  $\mu$ g) de músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> en los estadios post-natal 7, 15, 30 días y adulto. Gel teñido con Azul de Coomassie. **B.** Análisis de expresión de proteína C lenta por Western blot en extractos proteicos totales (80  $\mu$ g) de LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> en los estadios post-natal 7, 15, 30 días y adulto. **C.** Análisis de expresión de proteína C rápida por Western blot en extractos proteicos totales (80  $\mu$ g) de LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> en los estadios post-natal 7, 15, 30 días y adulto. Las flechas indican las masas relativas correspondientes al patrón de migración electroforética. (n=3).



**Figura 9. Los niveles de ARNm de SVCT2 decaen durante el desarrollo post-natal.**

**A.** Se extrajo RNA total de los músculos esqueléticos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> de pollos a los 16 días de incubación, 7, 15, 30 días post-natal y adulto, los cuales fueron transcritos a cDNA con transcriptasa reversa (RT+). Como control positivo se utilizó RNA total de cerebro de pollo embrionario (E18) obteniéndose un producto esperado de 589 bp para SVCT2 y 289 bp para β-actina (*panel superior*). **B.** Cuantificación relativa de las bandas de SVCT2 normalizado con β-actina. Las flechas a la derecha del panel superior indican el tamaño molecular de las bandas observadas. Los \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos analizado por Test de Student ( $n=3$ ).



comportamiento descendente en la expresión del transportador durante la vida post-natal, la expresión de SVCT2 a nivel del músculo lento LDA<sub>L</sub> fue más abundante en todas las etapas evaluadas en comparación con el músculo rápido LDP<sub>R</sub>. Estos resultados sugieren que el requerimiento intracelular de vitamina C en los músculos lentos es superior durante la embriogénesis tardía y en el período post-natal temprano, debido posiblemente a un rol por parte de SVCT2 en la mediación del ingreso de ácido ascórbico durante la miogénesis y en la etapa adulta en la regulación del equilibrio redox.

### 1.3.2. Distribución de SVCT2 en el músculo esquelético de pollo

Considerando que durante el período post-natal el músculo esquelético puede modificar su condición fenotípica en forma alternante y que los resultados obtenidos muestran que la expresión de SVCT2 a nivel de transcrito disminuyen progresivamente, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para analizar posibles modificaciones en la distribución de SVCT2 entre músculos lentos y rápidos. En la etapa embrionaria tardía (HH45) se utilizaron el músculo LDA<sub>L</sub> y el rápido *Rhomboideus superficialis* (RS<sub>R</sub>) siendo este último, considerado debido a su cercanía anatómica con respecto a LDA<sub>L</sub>. Por otra parte, en el estado post-natal (7 días y adulto) se utilizaron los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub>. Como controles se utilizaron anticuerpos monoclonales anti miosina lenta y la isoforma rápida de la bomba Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplásmico (Figura 10, 11 y 12). Adicionalmente a los estadios indicados anteriormente se evaluó la expresión de SVCT2 a los 30 días post-natal (Anexos 2 y 3).

En el caso de la etapa embrionaria tardía los resultados indican que todas las fibras de LDA<sub>L</sub> son positivas para miosina lenta y negativas para la isoforma rápida de la bomba Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplásmico, mientras que la mayoría de las fibras en Rs son positivas para la isoforma rápida de la bomba Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplásmico (Figura 10). Tal como se ha observado anteriormente en LDA adulto el anticuerpo anti SVCT2 marca todas las fibras musculares tipo I así como algunas escasas fibras lentas en LDP<sub>R</sub> (Figura 4). A mayor aumento, en las regiones A y B de la figura 10, se observa en detalle en

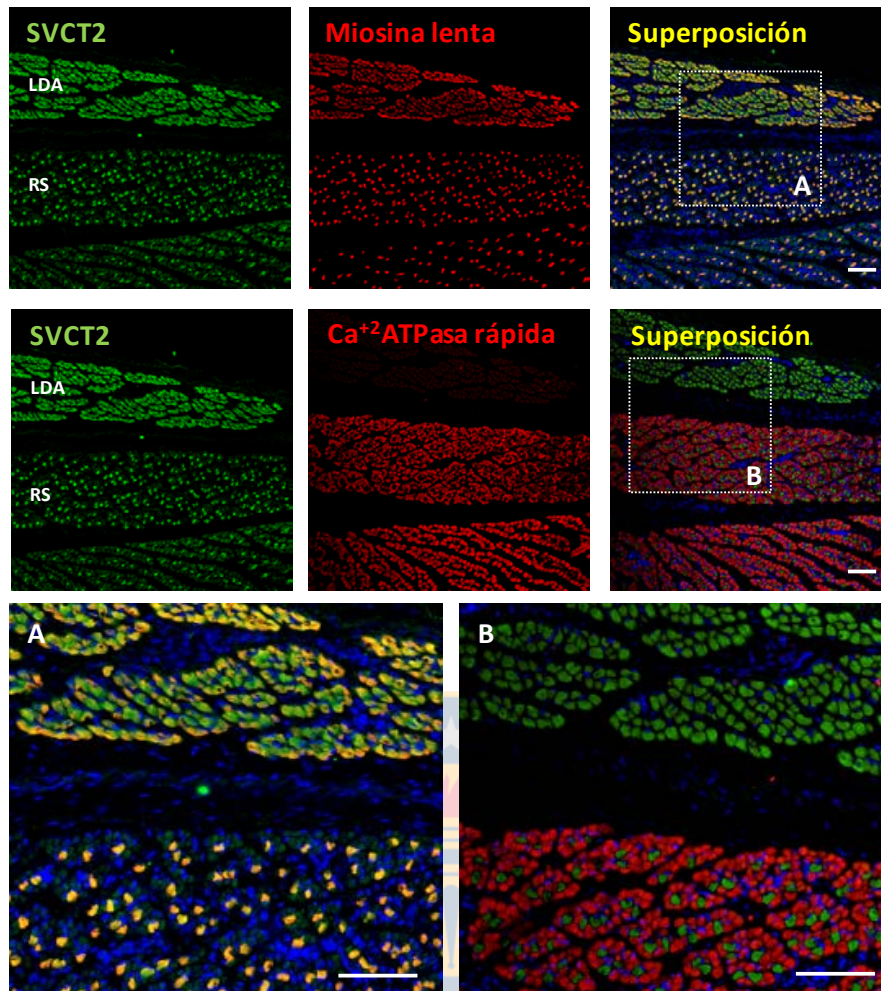
las fibras musculares de LDA<sub>L</sub> y Rs<sub>R</sub> la inmunorreactividad excluyente de SVCT2 en fibras lentas con respecto a las rápidas.

A los 7 días de desarrollo post-natal, la distribución de SVCT2 es similar a lo observado en el estadio embrionario tardío (HH45). En este músculo la señal inmunorreactiva para SVCT2 presenta una colocalización perfecta con miosina lenta. Por otra parte, respecto a lo observado en LDA<sub>L</sub> a los 7 días post-natal, el músculo LDP<sub>R</sub> presenta una menor proporción de fibras SVCT2-miosina lenta positivas (Figura 11).

En la etapa adulta el patrón de distribución de SVCT2 se observa restringido a las fibras lentas. En este sentido las fibras lentas presentes en los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> son positivas para SVCT2. Sin embargo, el músculo LDA<sub>L</sub> presenta un predominio de fibras lentas que se correlaciona directamente con la naturaleza fenotípica del músculo (Figura 12 y Anexo 3).

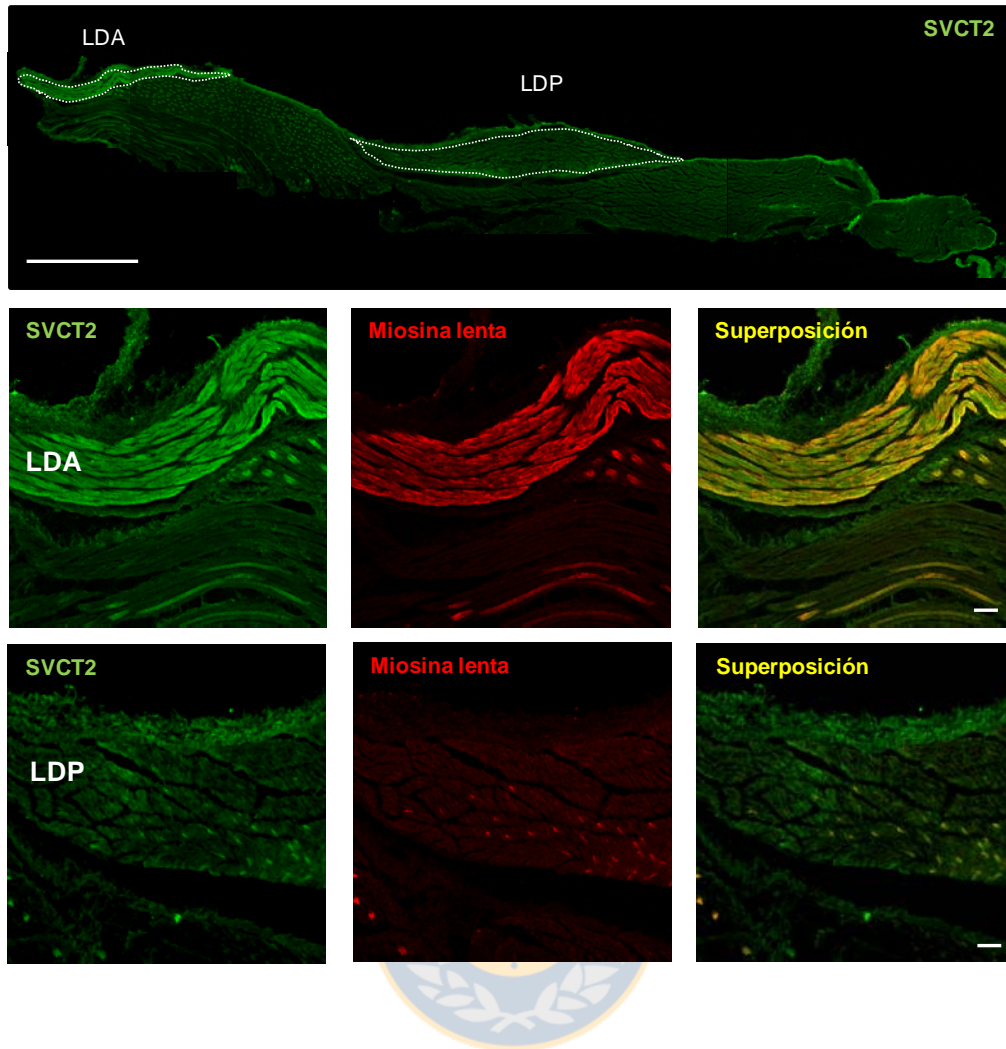
Con el propósito de evaluar si la distribución de SVCT2 se mantiene restringida a fibras lentas independientemente de la localización anatómica de los músculos, se realizaron ensayos de inmunolocalización para SVCT2 en el músculo lento *Medial adductor* (MA<sub>L</sub>) y rápido *Pectoralis major* (PM<sub>R</sub>) disecados de la región interna de la pierna y región pectoral, respectivamente. Los resultados obtenidos en MA<sub>L</sub> y PM<sub>R</sub> concuerdan con lo observado en LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> en relación a la distribución preferencial de SVCT2 en fibras lentas. Por otra parte, los músculos LDP<sub>R</sub> y PM<sub>R</sub> presentan fibras SVCT2 positivas en menor cantidad y distribuidas aisladamente (Figura 13). Estos resultados permiten concluir que la definición de los músculos lentos en la etapa adulta se correlaciona directamente con la expresión de SVCT2 por parte de las fibras lentas. Por otro lado, ellos sugieren la posibilidad de que la definición del fenotipo lento esté relacionada con la expresión de SVCT2 y por los niveles de vitamina C que sean internalizadas en estas fibras musculares.

Debido a que los ensayos inmunohistoquímicos llevados a cabo en músculos de aves demuestran una distribución preferencial de SVCT2 en fibras lentas en pollos, nosotros evaluamos la distribución del transportador en una especie que evolutivamente ha perdido la capacidad de sintetizar vitamina C y por ende la ob-



**Figura 10. SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo durante la etapa embrionaria tardía.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones de músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> de pollos (HH42). Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) en músculo LDA<sub>L</sub> y Rs<sub>R</sub>. Adicionalmente, las criosecciones fueron incubadas con anticuerpo anti Miosina lenta y revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo). Imágenes de colocalización SVCT2 y miosina lenta (*panel superior derecho*). Criosecciones de músculos LDA<sub>L</sub> y Rs<sub>R</sub> de pollos, fueron incubadas con un anticuerpo primario anti Ca<sup>2+</sup> ATPasa rápida y revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo). Imágenes de colocalización SVCT2 y SERCA1 (*panel intermedio derecho*). Imágenes **A** y **B** secciones magnificadas de superposición respectivas. Barra 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 11. SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo durante la etapa post-natal temprana.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones transversales de la musculatura dorsal de pollo a los 7 días de edad. Las criosecciones fueron incubadas con un primer anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde). Adicionalmente, las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti miosina lenta y revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo). Barra 1 mm (*panel superior*). Barra 50  $\mu$ m (*panel intermedio e inferior*).

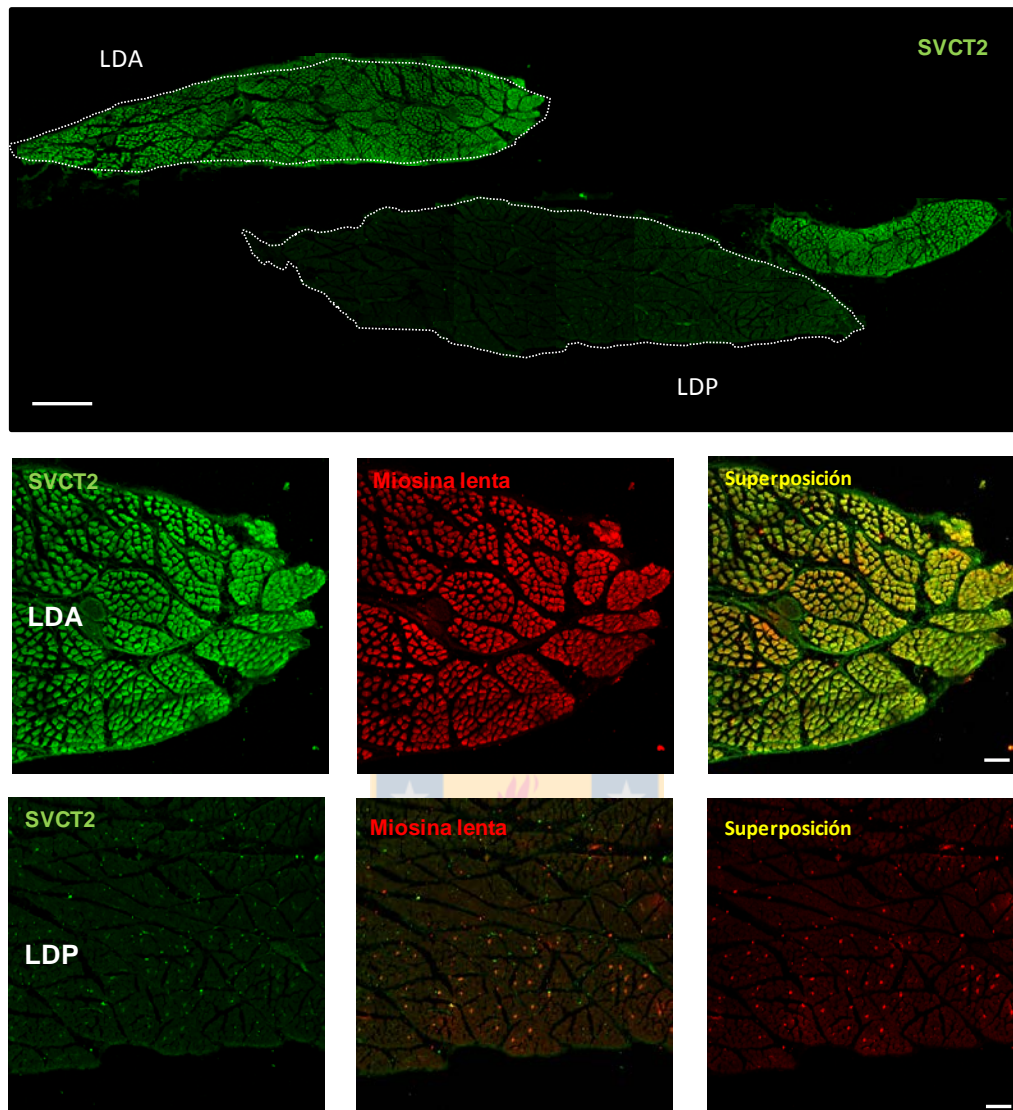
tiene exclusivamente desde la dieta. Para esto realizamos ensayos de inmunolocalización de SVCT2 en criosecciones de músculo esquelético humano obtenido desde la región lumbar. Como indicador de la naturaleza fenotípica de las fibras se utilizaron anticuerpos anti SVCT2 y monoclonales anti miosina lenta y rápida. Nuestros resultados demuestran la localización preferencial de SVCT2 en fibras lentas de manera similar a lo observado en aves, siendo las fibras SVCT2 positivas para miosina lenta. Por el contrario las fibras positivas a miosina rápida no co-localizan con SVCT2 (Figura 14). Un aspecto interesante de nuestros resultados es la localización conservada de SVCT2 entre especies, lo que sugiere que independientemente de la capacidad de sintetizar vitamina C, la expresión de SVCT2 corresponde a un mecanismo desarrollado por el organismo para regular los niveles de vitamina C en las fibras musculares.

#### **1.4. Distribución intracelular de SVCT2 en fibras musculares lentas oxidativas**

Debido a que nuestros ensayos inmunohistoquímicos demostraron que la expresión de SVCT2 es preferencial en fibras lentas en los distintos músculos analizados durante la etapa embrionaria tardía y post-natal, nos propusimos determinar la localización intracelular de SVCT2. En primera instancia, y con el propósito de delimitar las fibras musculares, criosecciones transversales del músculo LDA fueron co-incubadas con los anticuerpos anti SVCT2 y anti laminina, una proteína de la lámina basal (Figura 15, *panel superior y A*). La observación detallada de las criosecciones longitudinales mostraron que SVCT2 presenta un patrón de distribución estriado transversal dispuesto en toda la extensión de la fibra (Figura 15, *panel intermedio y B*). Según nuestros análisis y con el grado de detección con el cual contamos no se pudo determinar la expresión de SVCT2 a nivel de la membrana plasmática (Figura 15, *panel intermedio y B*).

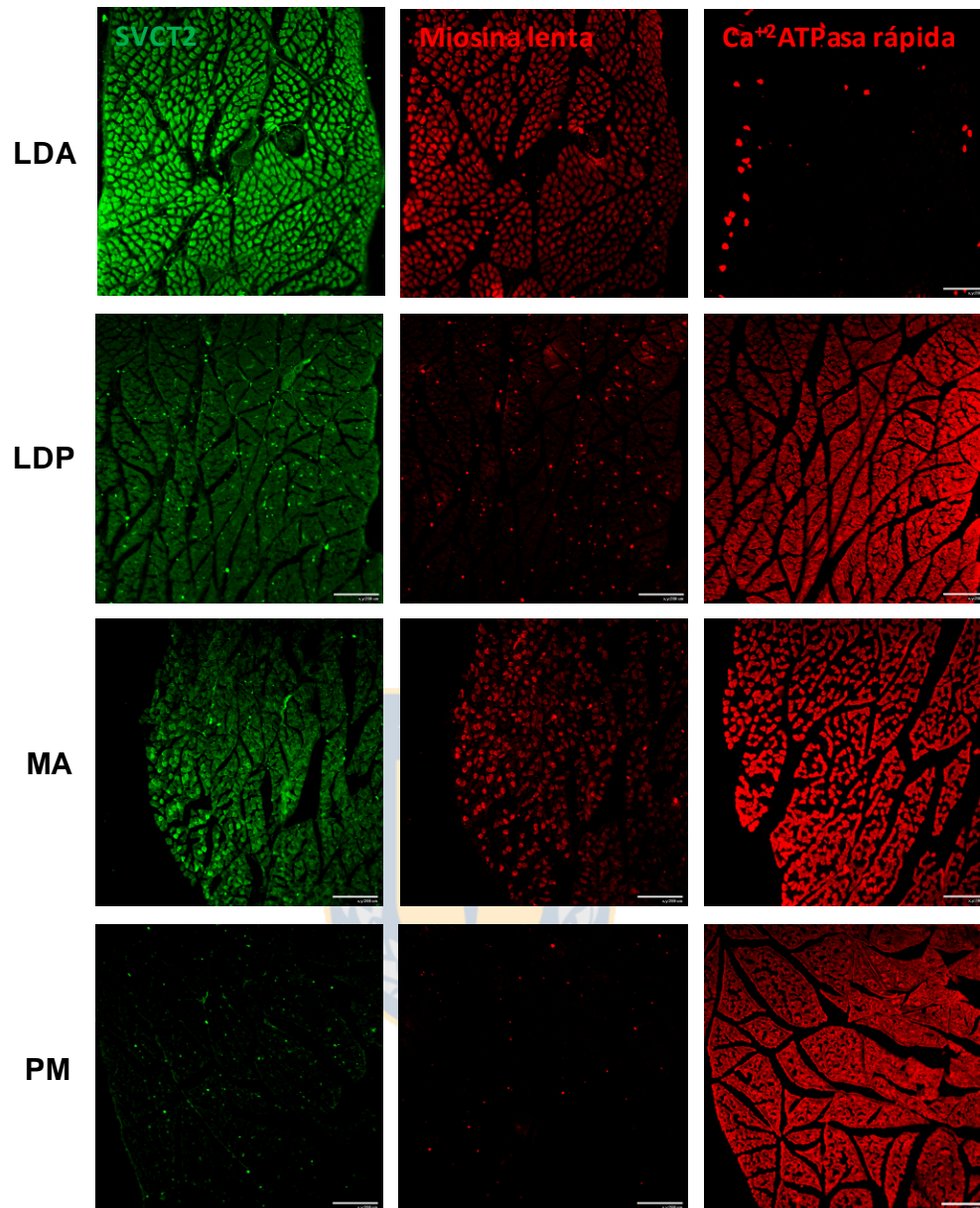
Adicionalmente, una evaluación en los músculos LDA<sub>L</sub> y MA<sub>L</sub> y los músculos LDP<sub>R</sub> y PM<sub>R</sub> de pollo adulto confirmó la distribución intracelular bajo el mismo patrón (Figura 16). Considerando los resultados obtenidos por medio de los ensayos de inmunohistoquímica, así como los antecedentes estructurales del transportador y a la organización estructural de las fibras, nosotros concluimos que





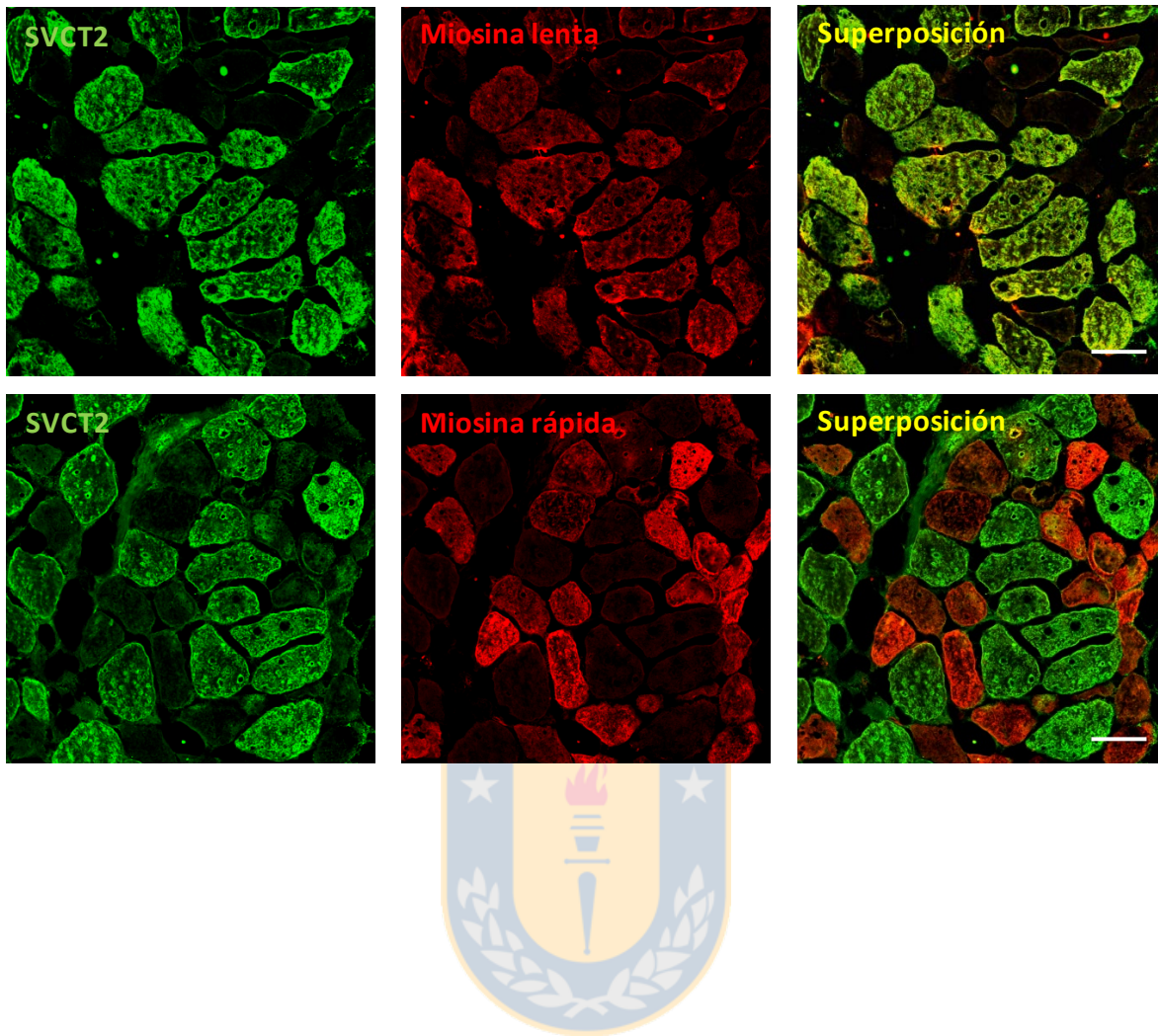
**Figura 12. SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo durante la etapa adulta.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones transversales de la musculatura dorsal de pollo adulto. Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). Adicionalmente, las criosecciones fueron incubadas con anticuerpo primario anti miosina lenta y revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo) y ToPro3 (azul). Barra 1mm (*panel superior*). Barra 200  $\mu\text{m}$  (*panel intermedio e inferior*).



**Figura 13. SVCT2 se distribuye a nivel de las fibras musculares lentas oxidativas en distintos músculos esqueléticos de pollo adulto.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones de músculos lentos LDA<sub>L</sub> y MA<sub>L</sub> y rápidos LDP<sub>R</sub> y PM<sub>R</sub> de pollos de adultos. Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) (*panel izquierdo*). Adicionalmente, las criosecciones fueron incubadas con anticuerpo anti Miosina lenta y revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo) (*panel central*). Cortes seriados de las mismas criosecciones anteriores, fueron incubadas con un primer anti Ca<sup>2+</sup> ATPasa rápida revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo) (*panel derecho*). Barra 100 µm.



**Figura 14. La expresión de SVCT2 está restringida a fibras lentas oxidativas en el músculo esquelético humano.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones de músculos dorso-lumbar de humano. Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2, revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) (*panel izquierdo*). Adicionalmente, las criosecciones fueron incubadas con anticuerpo primario anti miosina lenta o rápida y revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo) (*panel central*). Imágenes de co-localización entre SVCT2 y miosina (*panel derecho*). Barra 100  $\mu\text{m}$ .



SVCT2 debería localizarse en algún subdominio interno de membrana. Estas observaciones y antecedentes previos dan paso a los siguientes cuestionamientos con respecto a SVCT2 ¿Cuál es la localización subcelular del transportador SVCT2 en las fibras lentas oxidativas? ¿Cuál o cuáles son las implicancias de su localización subcelular en la fisiología muscular? Para responder a estas interrogantes, nosotros proponemos “*estudiar la localización subcelular de SVCT2 en músculo esquelético de pollo adulto*”.

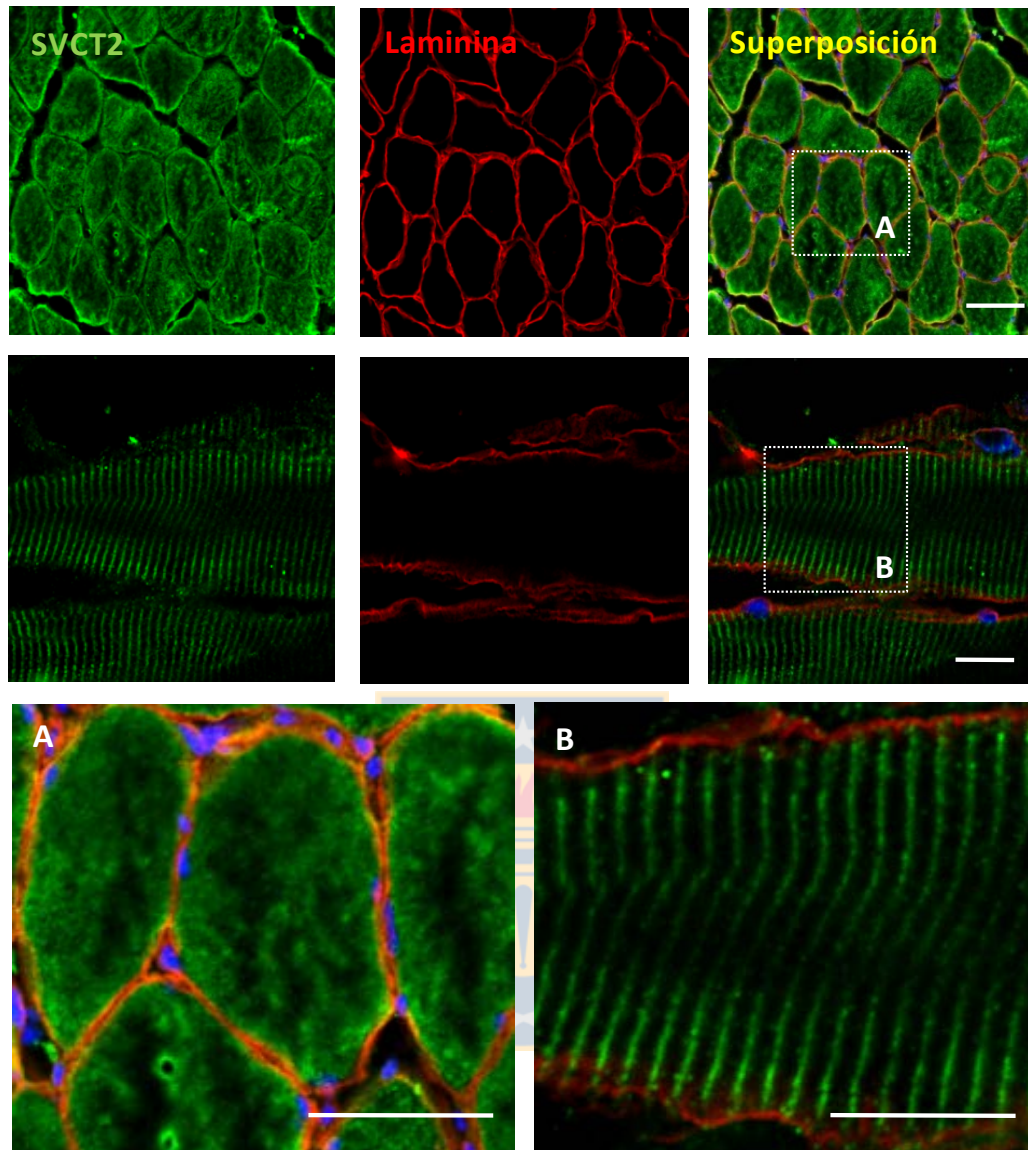
## **2. Patrón de distribución intracelular del co-transportador sodio ascorbato SVCT2 en fibras musculares lentas oxidativas**

### **2.1. Localización subcelular de SVCT2 en fibras musculares lentas oxidativas**

Los resultados obtenidos en nuestro primer objetivo han permitido determinar la expresión de SVCT2 en músculos lentos y una distribución preferencial en fibras musculares lentas oxidativas en un patrón estriado transversal.

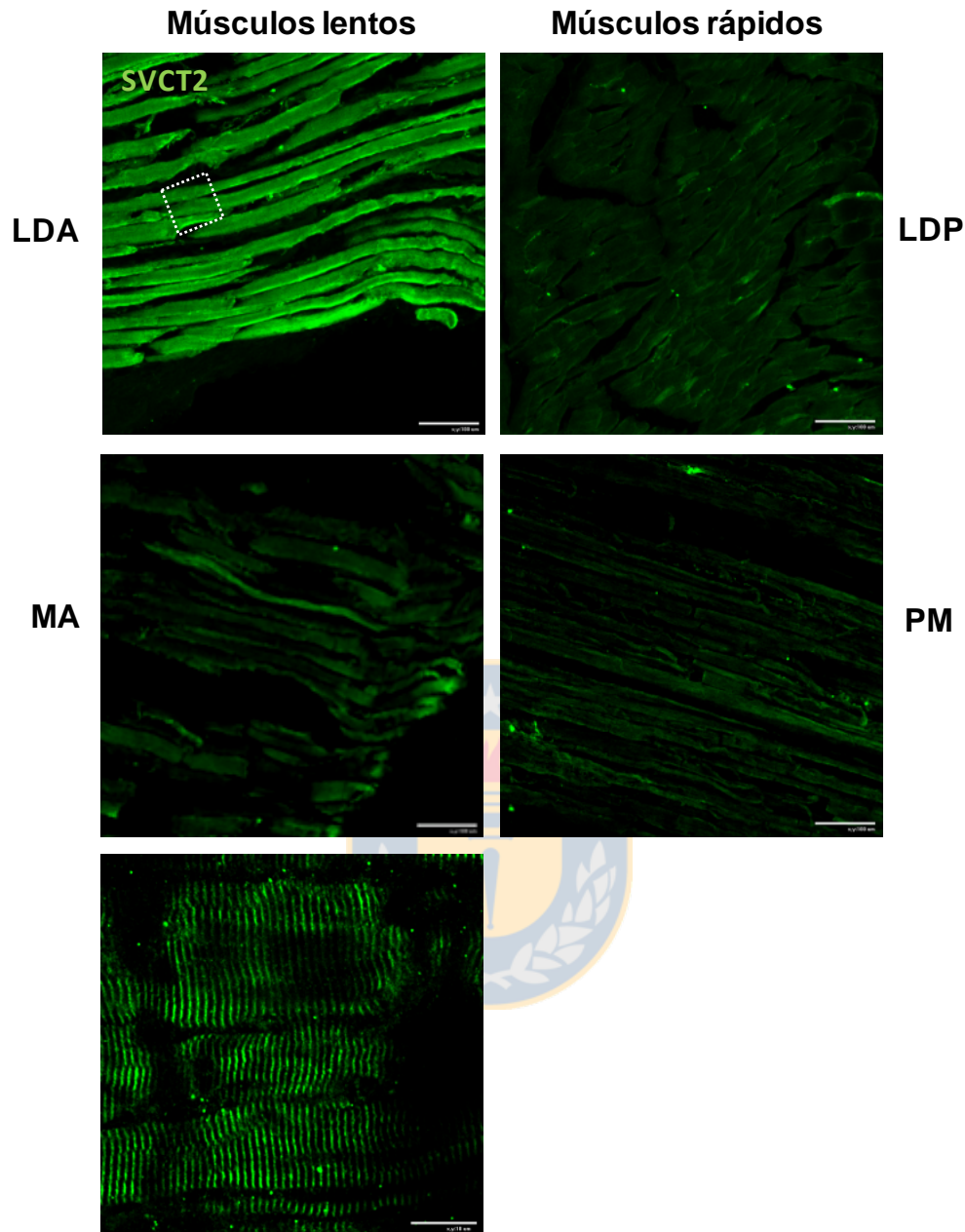
Los antecedentes estructurales descritos para este transportador consideran la existencia de 12 dominios transmembrana y loops dispuestos hacia ambas caras de la membrana plasmática, otorgándole al SVCT2 una conformación propicia para establecerse en dominios de membrana tal como se ha indicado en células nerviosas. Las fibras musculares presentan una organización muy estructurada de sus dominios internos de membrana, por lo que la ubicación del SVCT2 en estas regiones podría explicar su rol en la disponibilidad de vitamina C en las fibras y cómo esta podría regular la definición del fenotipo muscular.

Como se observa en la figuras 17 y 18, SVCT2 se distribuye intracelularmente en un patrón estriado transversal. Aún cuando el patrón de distribución presentó un aspecto regular, no se observó co-localización de SVCT2 con proteínas estructurales del sarcómero como titina (marcador de línea I) (Figura 16, *panel superior*), miosina lenta (marcador de banda A) (Figura 17, *panel intermedio*) y desmina (marcador de línea Z) (Figura 17, *panel inferior*). Sin embar-



**Figura 15. SVCT2 se distribuye intracelularmente bajo un patrón estriado transversal en fibras musculares lentas oxidativas de pollo adulto.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones de músculos LDA<sub>L</sub> pollos de adultos. Las criosecciones, fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2, revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). Adicionalmente, las criosecciones fueron incubadas con anticuerpo primario anti laminina y revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo) Superposición de imágenes SVCT2 y laminina (rojo-verde) (*panel superior e intermedio*). Barra 50  $\mu\text{m}$ . Las imágenes **A** y **B** corresponden a regiones magnificadas de cortes transversales y longitudinales respectivamente. Barra 15  $\mu\text{m}$ .



**Figura 16. El patrón estriado transversal de SVCT2 se distribuye de forma similar en distintos músculos esqueléticos de pollo.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones de músculos lentos LDA<sub>L</sub> y MA<sub>L</sub> y rápidos LDP<sub>R</sub> y PM<sub>R</sub> de pollos de adultos. Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). Panel inferior corresponde a la región delimitada en LDA<sub>L</sub>. Barra 100 µm.

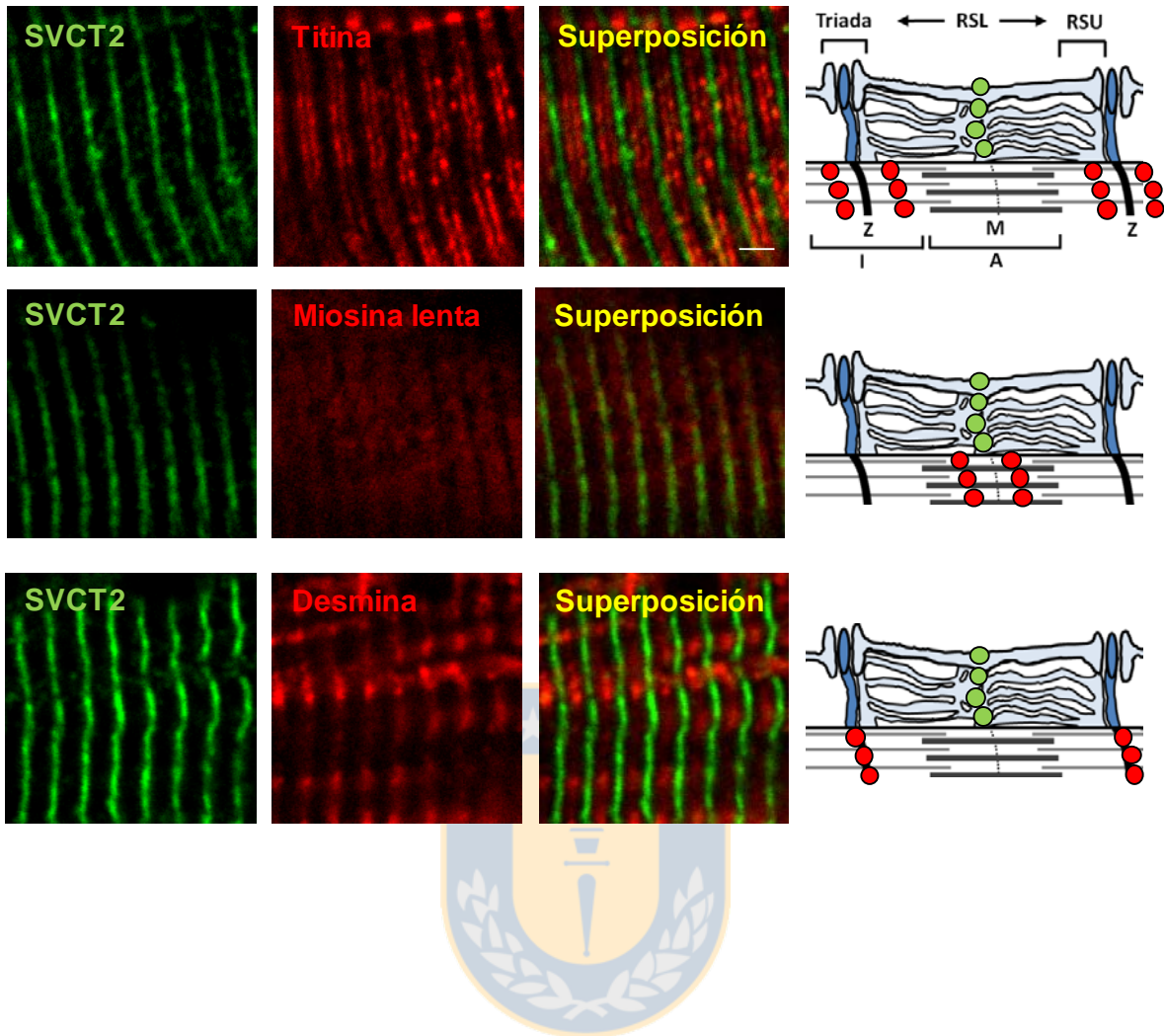
go, titina y desmina definieron regiones en el interior de la fibra en donde no se detectó señal pero en las que sí fue detectado SVCT2. Por otra parte, en la región central de la señal inmunorreactiva para miosina lenta fue localizado SVCT2 (Figura 17, *panel intermedio*). Un fenómeno similar de exclusión de co-localización fue observado entre SVCT2 y proteína C lenta (Figura 18, *panel superior*). Un hallazgo interesante fue un alto grado de relación topográfica entre SVCT2 y Miomesina (proteína estructural del sarcómero localizada a nivel de la línea M) (Figura 18, *panel intermedio*) y una parcial co-localización de SVCT2 y el receptor de rianodina (marcador de cisternas terminales del retículo sarcoplásmico) (Figura 18, *panel inferior*).

Considerando la organización del sarcómero y las membranas internas asociadas, nuestros resultados nos permiten sugerir que SVCT2 se localiza a nivel de regiones internas de membrana presumiblemente a nivel del retículo sarcoplásmico en cercanía topográfica con la línea M.

Con la finalidad de evaluar el grado de co-localización entre SVCT2 y proteína C lenta, el receptor de rianodina y miomesina, regiones definidas entre 9 a 11  $\mu\text{m}$  de longitud, obtenidas a partir de criosecciones longitudinales de fibras lentas fueron sometidas a un análisis de intensidades de fluorescencia. La fluorescencia de la región fue separada en los canales de fluorescencia respectivos y sus espectros fueron graficados superponiendo las señales (Figura 18). Los resultados obtenidos muestran que la intensidad y la distancia aproximada de las señales entre SVCT2 y miomesina son similares, indicando que estas señales presentan un alto grado de co-localización debido al solapamiento de los picos de fluorescencia (Figura 19). En el caso del grado de co-localización entre SVCT2 y proteína C lenta o entre SVCT2 y el receptor de rianodina, si bien los resultados muestran una parcial sobreposición de las señales, los picos de fluorescencia de SVCT2 están dispuestos centralmente en relación a la señales para proteína C lenta y el receptor de rianodina (Figura 19).

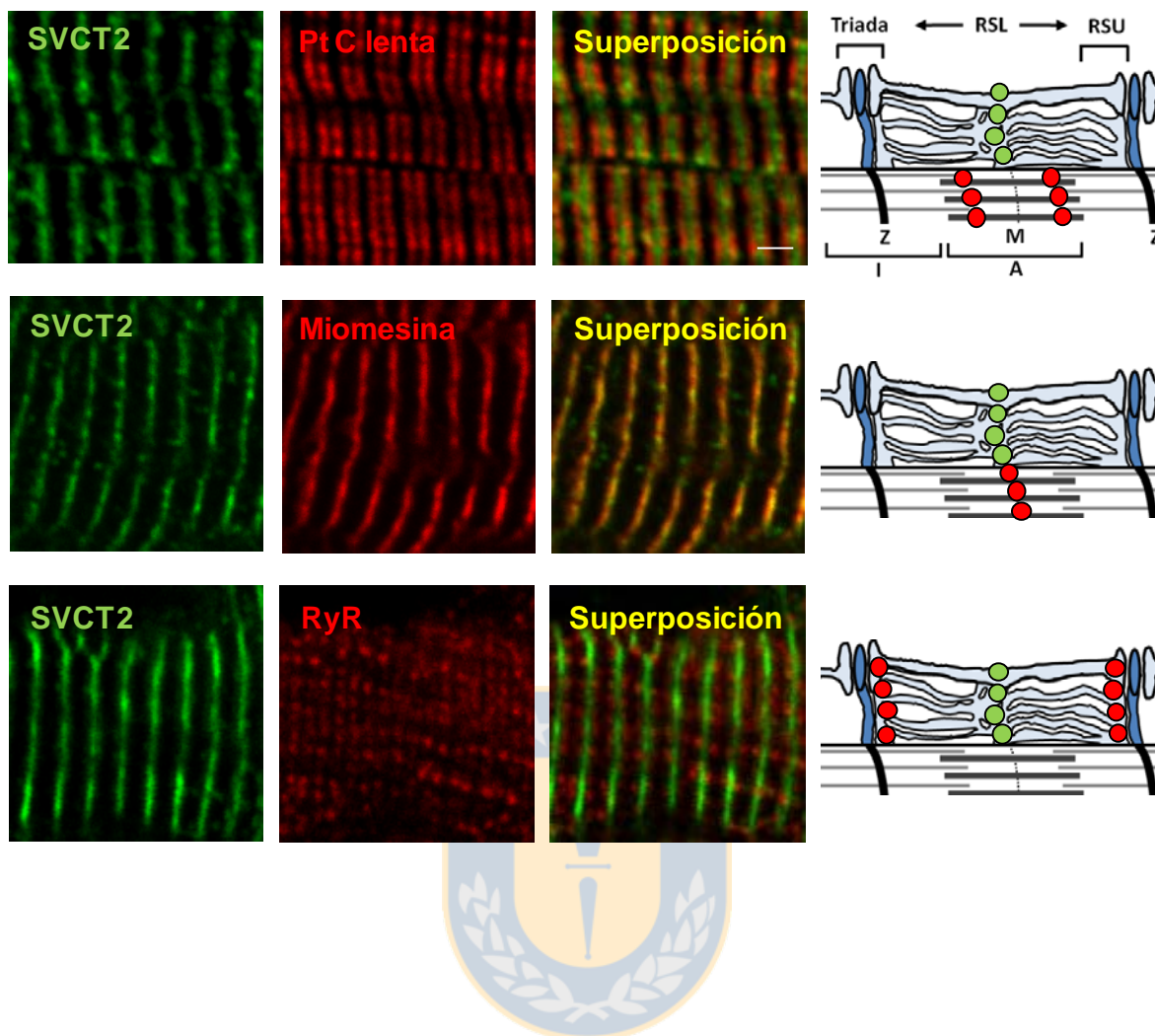
Considerando, que SVCT2 se expresa en humanos de forma similar a lo observado en aves, nosotros procedimos a evaluar su localización intracelular a





**Figura 17. Comparación de la localización de SVCT2 respecto a titina, miosina y desmina en fibras musculares lentas.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones longitudinales de músculos lento LDA<sub>L</sub> de adultos. Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). Paralelamente fueron incubadas con anticuerpos primarios anti titina, anti miosina lenta y anti desmina y posteriormente revelados con un anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo). Imágenes de co-localización. Barra 5 μm. **Panel derecho.** Representación esquemática de la localización subcelular del SVCT2 en las fibras musculares lentas oxidativas de pollo. *Retículo sarcoplásmico longitudinal (RSL)*, *Retículo sarcoplásmico de unión (RSU)*, *Triada (túbulo T, azul; Cisternas terminales, celeste)*.

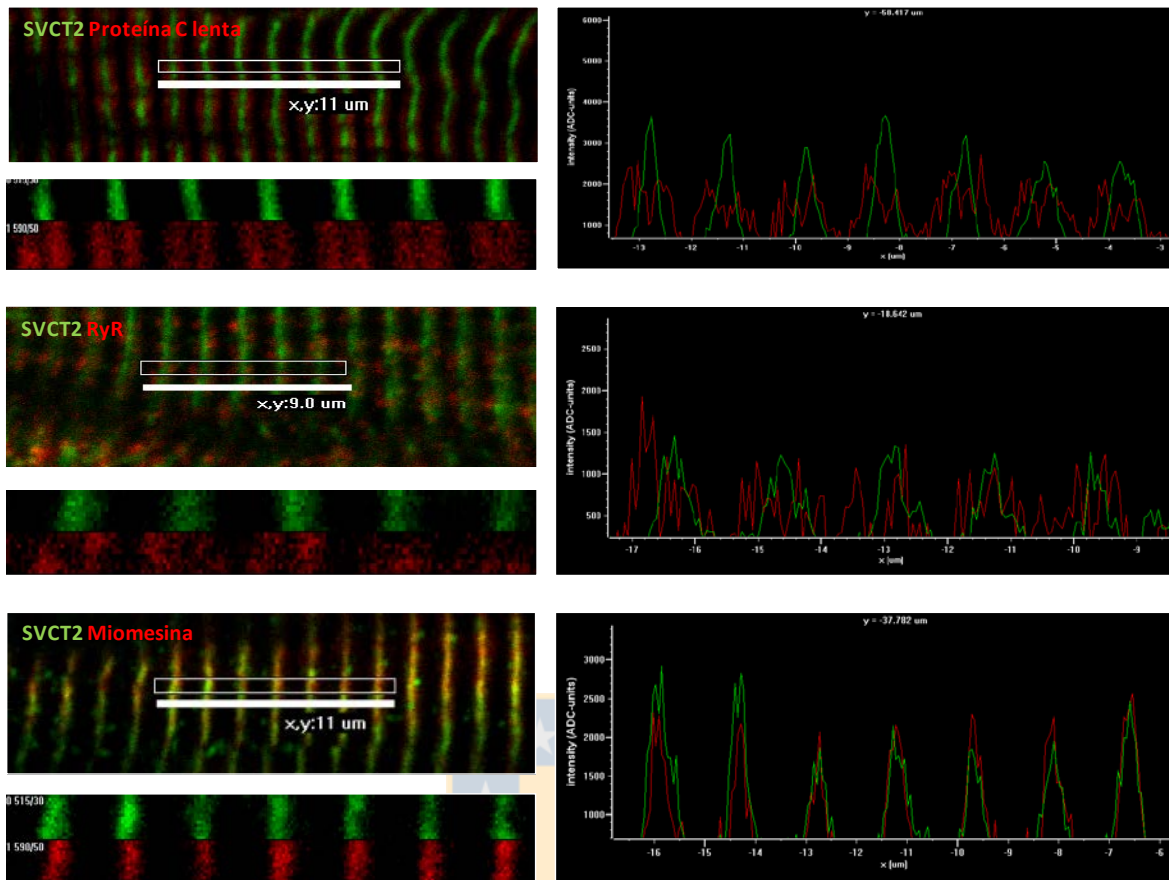


**Figura 18. Comparación de la localización de SVCT2 respecto a proteína C lenta, miomesina y RyR en fibras musculares lentas.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones longitudinales de músculos lento LDA<sub>L</sub> de adultos. Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). Paralelamente fueron incubadas con anticuerpos primarios anti proteína C lenta, anti miomesina y anti RyR y posteriormente revelados con un anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo). Imágenes de co-localización. Barra 5  $\mu$ m. **Panel derecho.** Representación esquemática de la localización subcelular del SVCT2 en las fibras musculares lentas oxidativas de pollo. *Retículo sarcoplásmico longitudinal (RSL)*, *Retículo sarcoplásmico de unión (RSU)*, *Triada (túbulo T, azul; Cisternas terminales, celeste)*.

través de ensayos de inmunohistoquímica. Criosecciones longitudinales de músculos lumbares humanos, fueron co-incubadas con el anticuerpo anti SVCT2 junto con los anticuerpos monoclonales anti receptor de rianodina y anti miomesina (Figura 20A). Los resultados observados indican que SVCT2 co-localiza con miomesina de forma similar a lo observado en aves y co-localiza parcialmente con el receptor de rianodina (Figura 20A). Con la finalidad de definir el grado relación topográfica entre SVCT2 y miomesina se analizaron sus intensidades de fluorescencia. Como se observa en la figura 20B, la señales de SVCT2 y miomesina se presentaron al mismo nivel respecto al sarcómero debido al alto grado de superposición de sus picos de fluorescencia. Por lo tanto, nosotros concluimos que la distribución intracelular de SVCT2 en fibras musculares es conservada entre especies.

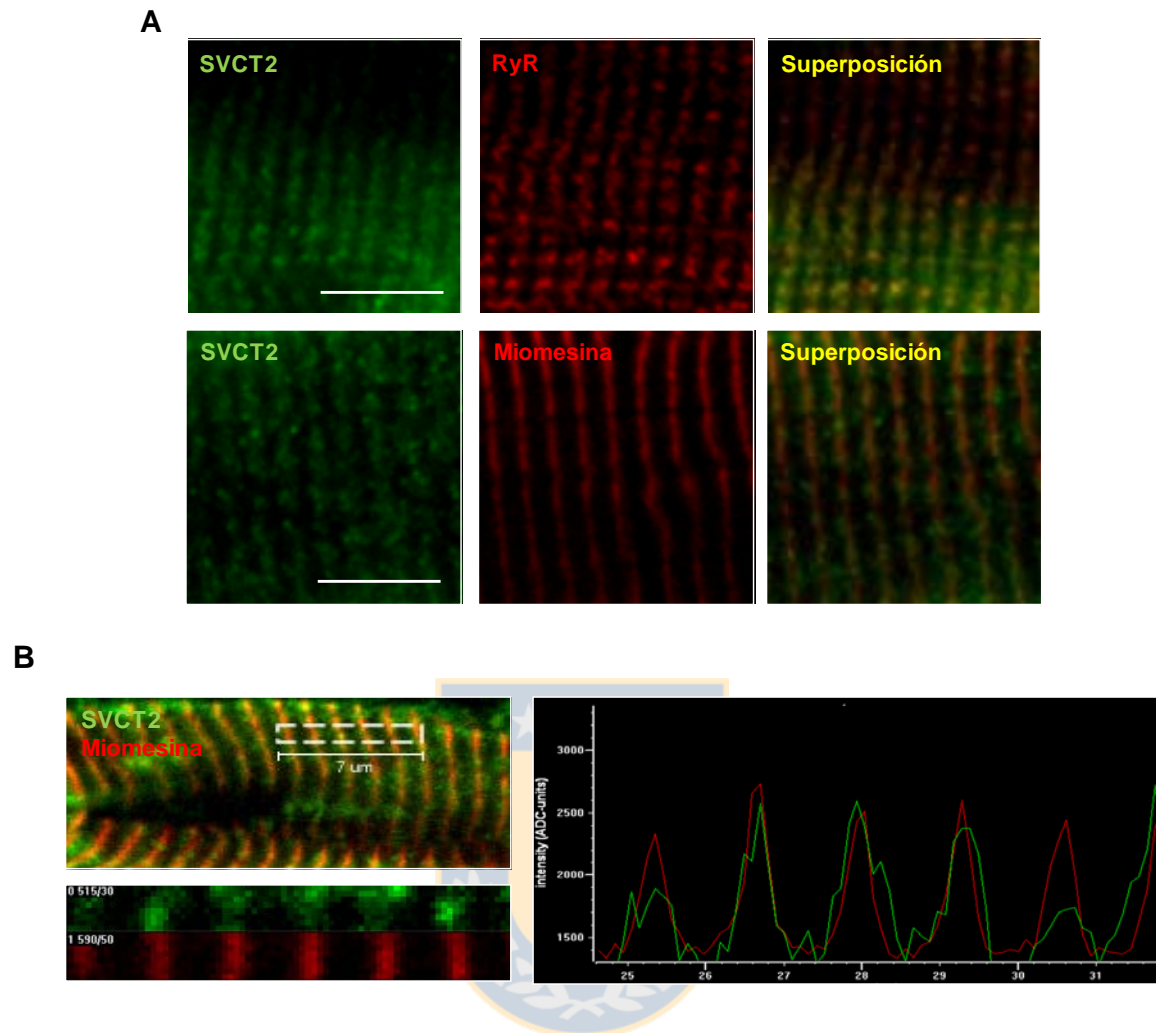
Si bien SVCT2 presentó un alto grado de relación topográfica con un marcador estructural del sarcómero como miomesina, la relación con el receptor de rianodina y sus antecedentes conformacionales nos hacen sugerir que este transportador se localiza en un subdominio de membrana interno en las fibras musculares, que corresponde al retículo sarcoplásmico. Diversos estudios han demostrado que centrifugaciones sucesivas de homogenizados de músculos esqueléticos en conjunto con el tratamiento de tampones a diferentes concentraciones iónicas y la utilización de detergentes permiten recuperar dominios de membranas internas enriquecidas en proteínas como el receptor de rianodina, la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico y el receptor de dihidropiridina. Con el propósito de definir la localización de SVCT2 en regiones internas de membrana en las fibras musculares, los músculos  $\text{LDA}_L$  y  $\text{MA}_L$  fueron disecados y homogenizados obteniéndose un extracto total (ET). Posteriormente este extracto fue centrifugado a baja velocidad para separar los mionúcleos de un sobrenadante (S). El sobrenadante obtenido se centrifugó a alta velocidad obteniendo un sobrenadante (S1) enriquecido en proteínas citosólicas (sarcoplásmicas) y un pellet de microsomas pesados (MP), las que corresponden a estructuras selladas de membrana formadas artificialmente por el fraccionamiento, en las cuales es posible determinar la expresión de proteínas de



**Figura 19. El análisis de microscopía confocal demuestra que SVCT2 se localiza en dominios de membrana intracelular.**

Crio-secciones longitudinales de músculos lento LDA<sub>L</sub> de adultos fueron co-incubadas con anticuerpos primarios anti SVCT2 y anti Proteína C lenta (*panel superior*), anti SVCT2 y anti RyR (*panel central*) y anti SVCT2 y anti miomesina (*panel inferior*) y revelados con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) y un anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo). Gráficos comparativos de picos de intensidades de fluorescencia para SVCT2, proteína C lenta, RyR y miomesina por canal (unidades ADC, arbitrary density channel) en cada imagen de colocalización por sección analizada.

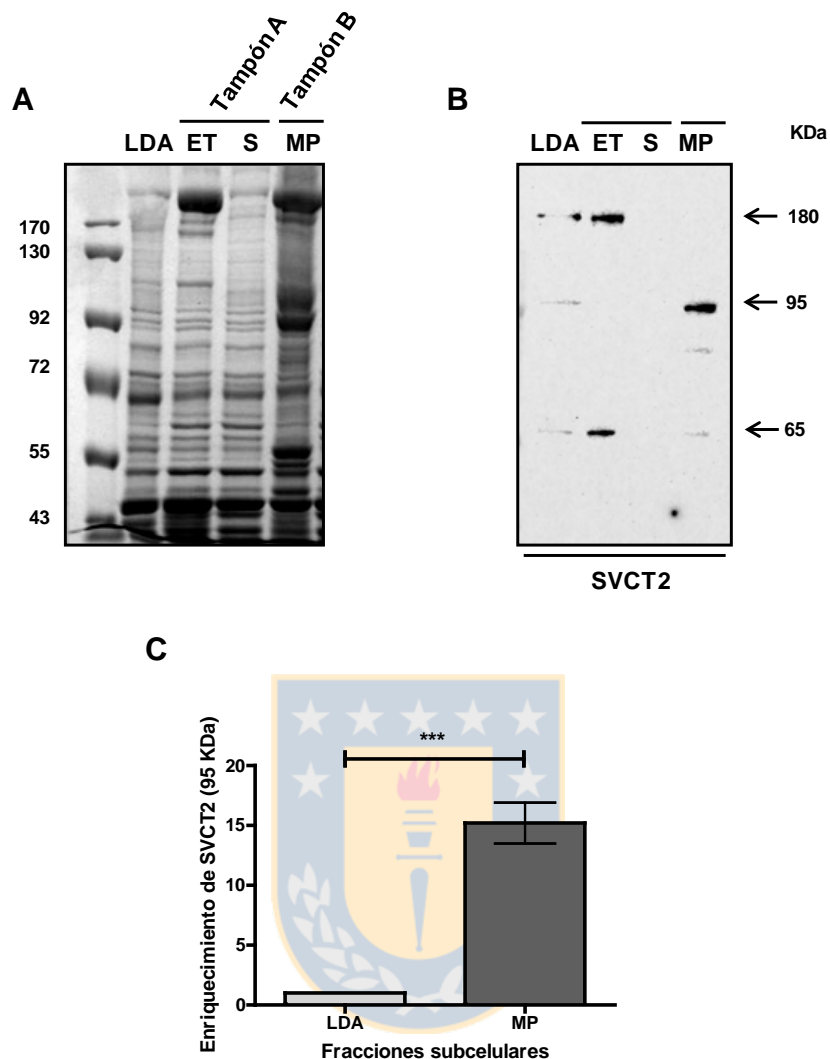




**Figura 20. SVCT2 se localiza dominios internos de membrana en las fibras musculares lentas de humanos.**

**A.** Criosecciones longitudinales de músculos dorso-lumbar de humano, fueron co-incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y anti RyR (*panel superior*) y anti SVCT2 y anti Miomesina (*panel inferior*) revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde) y anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo). **B.** Análisis de fluorescencia por señal para SVCT2 y miomesina (*panel izquierdo*). Gráfico comparativo de picos de intensidades de fluorescencia por SVCT2 y Miomesina (unidades ADC, arbitrary density channel) (*panel derecho*).

membrana. Considerando las propiedades físico-químicas que determinan la asociación de las proteínas a las membranas biológicas, la fracción de microsomas pesados fue sometida a dos protocolos de subfraccionamiento. En el primero se aplicaron concentraciones crecientes de NaCl, lo que permite la disociación de las interacciones existentes entre las distintas proteínas de membrana y del sarcoplasma con proteínas estructurales del sarcómero, seguido de la utilización del detergente no iónico Tritón X-100 utilizado para solubilizar las proteínas asociadas a las membranas obtenidas desde estos microsomas (*fraccionamiento fuerza iónica-detergente*). En el segundo protocolo los MP fueron tratados inicialmente con Tritón X-100 para solubilizar las proteínas asociadas a las membranas y luego fueron aplicadas concentraciones crecientes de NaCl que permiten la disociación de las interacciones entre las distintas proteínas (*fraccionamiento detergente-fuerza iónica*). Así, el MP fue resuspendido en un tampón con alta concentración de NaCl (500 mM) y nuevamente centrifugado a alta velocidad, obteniéndose un sobrenadante (S2) y un pellet (P3). Finalmente, el P3 fue resuspendido en un tampón con 500 mM NaCl y 0,5% Tritón x-100, obteniendo el sobrenadante (S3) y el pellet (P4) de proteínas insolubles como parte del fraccionamiento fuerza iónica-detergente. Paralelamente, los MP fueron resuspendidos con un tampón 100 mM NaCl y 0,5% Tritón X-100, obteniendo S2 y P3, para finalmente resuspender al P3 con un tampón con 500 mM NaCl y 0,5% Tritón X-100, como parte del fraccionamiento detergente-fuerza iónica. Como control de carga 30 ug de los extractos de proteínas totales de LDA<sub>L</sub> y fracciones ET, S y MP fueron separadas en gel de acrilamida-bisacrilamida 9% p/v y posteriormente teñidas con Azul de Coomassie. En los extractos LDA<sub>L</sub>, ET y S se observó un patrón similar de migración electroforética de sus proteínas, salvo una banda reconocible de una masa molecular superior a 170 KDa observada en ET (Figura 21A). A diferencia de lo observado en los extractos anteriores, en MP se observó un notorio enriquecimiento de sus proteínas con masas moleculares entre los 43 a 55 KDa, 95 KDa y superior a 170 KDa (Figura 21A). Para la identificación de SVCT2 en estas fracciones, fueron realizados ensayos de Western blot. Las fracciones fueron separadas en geles de acrilamida-bisacrilamida 9% p/v para lue-



**Figura 21. SVCT2 segrega en microsomas pesados obtenidos de fibras musculares esqueléticas de pollo adulto.**

**A.** Patrón de migración electroforética de proteínas de extracto total de LDA<sub>L</sub> y LDA<sub>L</sub> más MA<sub>L</sub> (ET) y las fracciones de sobrenadante inicial (S) y microsomas pesados (MP) en gel teñido con Azul de Coomassie. Las flechas indican las masas relativas correspondientes al patrón de migración electroforética. **B.** Análisis de expresión de SVCT2 por Western blot en proteínas de extracto total de LDA<sub>L</sub> y LDA<sub>L</sub> más MA<sub>L</sub> (ET) y las fracciones de sobrenadante inicial (S) y microsomas pesados (MP) (30 µg). Las flechas a la izquierda indican la masa molecular de las proteínas detectadas. **C.** Comparación del enriquecimiento de SVCT2 en extractos totales de LDA<sub>L</sub> y la fracción MP.  $p < 0,05$  (n=3).

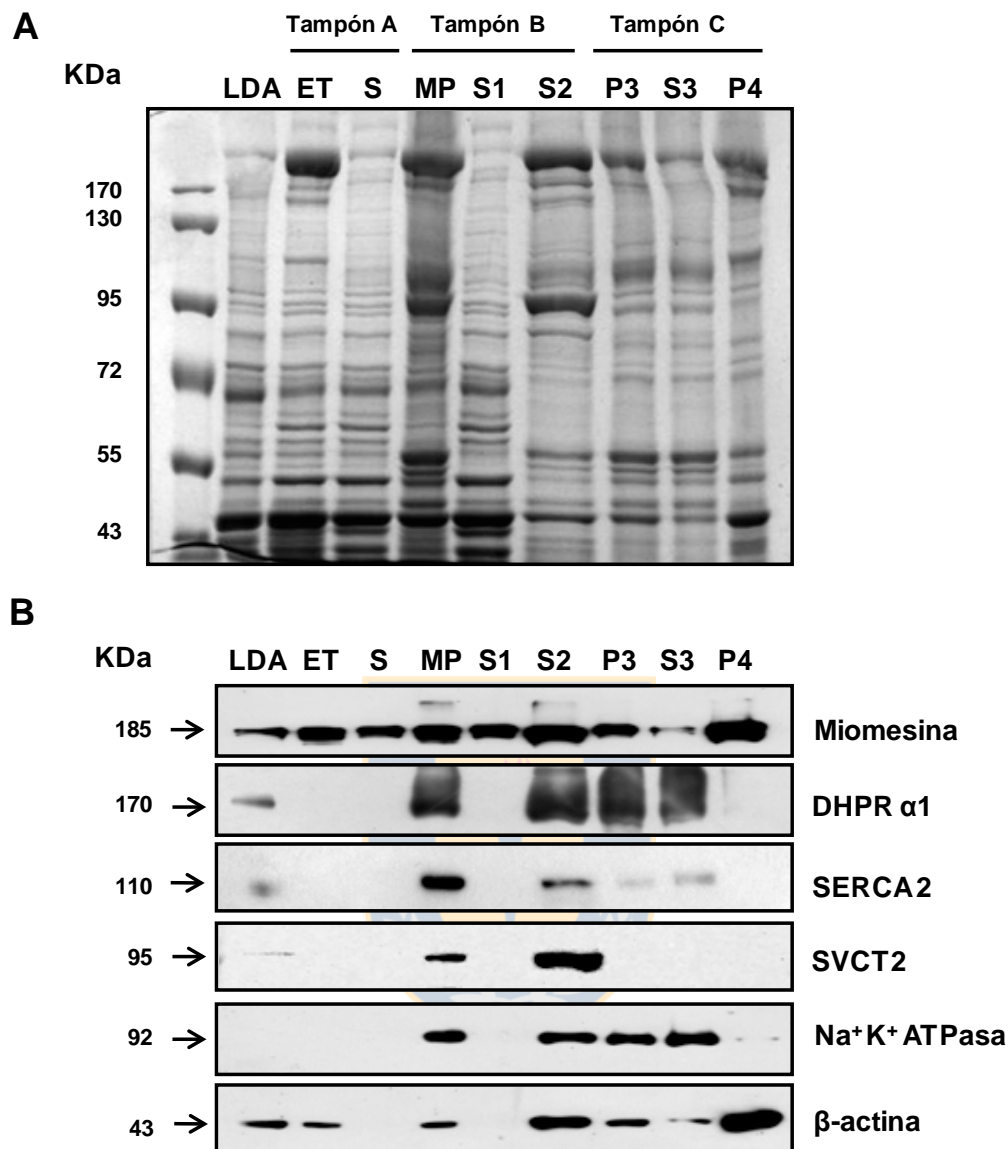
go ser transferidas a membrana PVDF y finalmente incubadas con el anticuerpo anti SVCT2 (Figura 20B). En los extractos de proteína total de LDA<sub>L</sub> se detectaron 3 bandas inmunorreactivas de 65, 95 y 180 KDa de forma similar a lo observado anteriormente (Figura 3). Por otra parte, en ET proveniente de una mezcla de los músculos LDA<sub>L</sub> y MA<sub>L</sub> se detectaron bandas de 65 y 180 KDa. En MP se detectaron 2 bandas inmunorreactivas para SVCT2 de 65 y 95 KDa. A diferencia de lo observado en los extractos y fracciones anteriormente descritas, no se detectó inmunoreactividad para SVCT2 en la fracción S (Figura 21B). De forma interesante, al realizar un análisis comparativo de las intensidades de inmunoreactividad para la banda de 95 KDa, se observó que a medida que el extracto inicial es fraccionado se produce un enriquecimiento del transportador en alrededor de 15 veces en la fracción de los microsomas pesados con respecto a los extractos de proteína total de LDA<sub>L</sub> (Figura 21C). Nuestros resultados sugieren que como resultado del fraccionamiento subcelular se produce una separación y enriquecimiento de las membranas internas de las fibras musculares en donde se encuentra localizado mayoritariamente el SVCT2.

Para determinar la composición de las fracciones de membranas obtenidas y la localización de SVCT2, se realizaron ensayos de Western blot en las fracciones derivadas de la aplicación de fuerza iónica y posteriormente detergente con anticuerpos monoclonales contra una proteína estructural, así como para las asociadas a membrana. Como control de carga 30 ug de proteínas totales del músculo LDA<sub>L</sub> y de las fracciones ET, S, MP, S1, S2, P3, S3 y P4, solubilizadas en el tampón A (100 mM NaCl), tampón B (500 mM NaCl) y tampón C (500 mM NaCl y tritón X-100 0,5%) fueron cargadas y separadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 9% p/v el que fue teñido con Azul de Coomassie (Figura 22A). Nuestros resultados muestran que en la fracción S2, al igual que MP existe un enriquecimiento de una banda de masa molecular de 95 KDa. Adicionalmente en las muestras S2 y sus derivadas P3, S3 y P4 fue observada una pérdida de bandas de masas moleculares entre 55 y 72 KDa (Figura 22A).

El análisis de expresión de SVCT2 y de las otras proteínas musculares fue realizado por ensayos de Western blot. Extractos de proteínas to-

tales del músculo LDA<sub>L</sub> como de las fracciones subcelulares fueron cargadas y separadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida 9% p/v para luego ser transferidas a membrana de PVDF e incubadas con los anticuerpos anti miomesina, subunidad  $\alpha 1$  del receptor de dihidropiridina (DHPR $\alpha 1$ ), isoforma lenta de la bomba Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA 2), SVCT2, bomba Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa y  $\beta$ -actina. Como se observa en la figura 22B, el SVCT2 se localiza en las fracciones MP y S2 como una banda inmunorreactiva de 95 KDa. Por otra parte, las proteínas de membrana como el receptor de dihidropiridina, isoforma lenta de la bomba Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplásmico y bomba Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa, se localizan mayoritariamente en las fracciones MP, S2, P3 y S3 con bandas inmunorreactivas únicas de 170, 110 y 92 KDa, respectivamente. Estos resultados permiten determinar que SVCT2 segrega en conjunto a estas proteínas de membrana. Particularmente, el enriquecimiento de SVCT2 se correlaciona directamente con el de la isoforma lenta de la bomba Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplásmico, la que se localiza subcelularmente a nivel del retículo sarcoplásmico. Por otra parte, miomesina y  $\beta$ -actina se localizan mayoritariamente en la fracción P4 como lo indican sus bandas inmunorreactivas de 185 y 43 KDa, respectivamente, lo que sugiere que estas proteínas estructurales se comportan como proteínas insolubles recuperadas en la fracción P4.

Para permitir la solubilización de SVCT2 y proteínas asociadas a membrana el MP fue sometido al tratamiento inicial con Tritón x-100, seguido de un incremento de la fuerza iónica mediante del aumento en la concentración de NaCl de 100 a 500 mM. Como control del fraccionamiento, 30  $\mu$ g de proteínas totales fueron cargadas y separadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 9% p/v. Posteriormente el gel fue teñido con Azul de Coomassie (Figura 23A, *panel superior*). Según se observa en la figura 23 (*panel superior*) producto del fraccionamiento se produce en enriquecimiento de proteínas con masas moleculares de 95 KDa y una pérdida parcial de proteínas con masas moleculares entre 34 a 43 KDa en MP con respecto al extracto total de LDA<sub>L</sub>, ET y S. Así mismo, en las fracciones P3, S3 y P4 se observó enriquecimiento de proteínas con



**Figura 22. Enriquecimiento de SVCT2 y proteínas musculares en fracciones de membranas tratadas con fuerza iónica y detergente.**

**A.** Patrón de migración electroforética de fracciones de membrana de músculo esquelético de pollo obtenidas por tratamiento con fuerza iónica y detergente teñidas con Azul de Coomassie. **B.** Análisis de expresión de proteínas por Western blot utilizando anticuerpos primarios anti miomesina, DHPR $\alpha$ 1, SERCA2, SVCT2, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa y  $\beta$ -actina y revelados con anticuerpos IgG conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). Proteínas de extracto total de LDA y fracciones; extracto total (ET), sobrenadante inicial (S) y microsomas pesados (MP), sobrenadante 1 (S1), sobrenadante 2 (S2), pellet 3 (P3), sobrenadante 3 (S3) y pellet 4 (P4). Las flechas indican las masas relativas correspondientes al patrón de migración electroforética. (n=3).

una masa molecular de 95 KDa. Como se observa en ambos protocolos de fraccionamiento, la aplicación de detergente y concentraciones crecientes de sales permite generar un enriquecimiento de distintas proteínas de masas moleculares específicas en cada una de las fracciones.

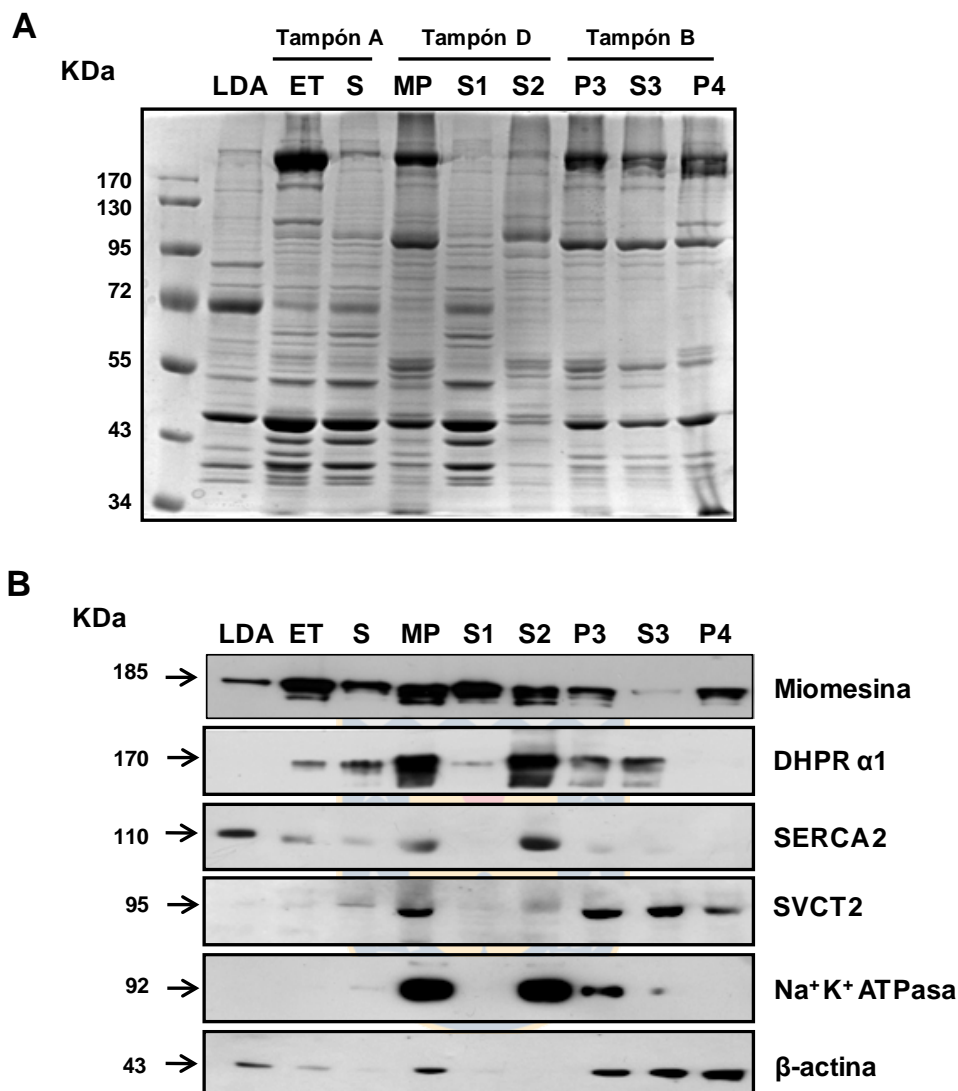
La localización de SVCT2 y las restantes proteínas utilizando el segundo protocolo de fraccionamiento fue resuelta por ensayos de Western blot. Para ello, extractos de proteínas totales y de las fracciones fueron cargadas y separadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 9% p/v para luego ser transferidas a membrana PVDF e incubadas con anticuerpos anti SVCT2, miomesina, subunidad  $\alpha 1$  del receptor de dihidropiridina, isoforma lenta de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico, bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa y  $\beta$ -actina (Figura 23B). SVCT2 (95 KDa) fue localizado mayoritariamente en las fracciones MP, P3 y S3. Las proteínas de membrana como la subunidad  $\alpha 1$  del receptor de dihidropiridina (170 KDa), isoforma lenta de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico (110 KDa) y bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa (92 KDa), fueron localizadas principalmente en las fracciones MP y S2. Por otra parte, a diferencia de lo observado en el fraccionamiento anterior, SVCT2 fue localizado en la fracción P3. Sin embargo, nuestros resultados muestran que SVCT2 no segrega de igual manera que isoforma lenta de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico en las fracciones S2, P3 y S3 (Figura 23B).

Con respecto a las proteínas estructurales como miomesina (185 KDa) y  $\beta$ -actina (43 KDa) estas fueron localizadas mayoritariamente en la fracción insoluble P4 (Figura 23B).

En base a nuestros resultados, nosotros podemos concluir que el tratamiento con una elevada concentración de NaCl permite solubilizar al SVCT2 contenido en las fracciones de membrana.

Para corroborar la especificidad del anticuerpo primario anti SVCT2 por la banda de 95 KDa, se realizaron ensayos de Western blot con extractos de proteínas totales de LDA, así como de las fracciones MP y S2, las que fueron separadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 9% p/v y posteriormente transferidas a una membrana PVDF. La neutralización del anticuerpo anti SVCT2

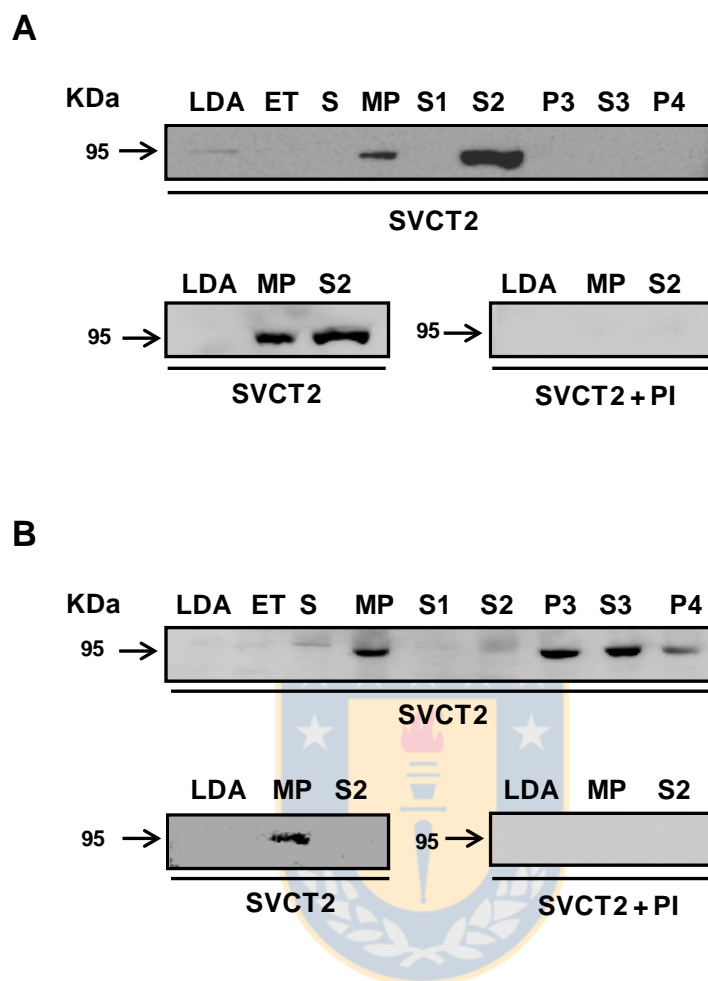




**Figura 23. Enriquecimiento de SVCT2 y proteínas musculares en fracciones de membranas tratadas con detergente y fuerza iónica.**

**A.** Patrón de migración electroforética de fracciones de membrana de músculo esquelético de pollo obtenidas por tratamiento con detergente y fuerza iónica teñidas con Azul de Coomassie. **B.** Análisis de expresión de proteínas por Western blot utilizando anticuerpos primarios anti miomesina, DHPR $\alpha$ 1, SERCA2, SVCT2, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa y  $\beta$ -actina y revelados con anticuerpos IgG conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). Proteínas de extracto total de LDA y fracciones; extracto total (ET), sobrenadante inicial (S) y microsomas pesados (MP), sobrenadante 1 (S1), sobrenadante 2 (S2), pellet 3 (P3), sobrenadante 3 (S3) y pellet 4 (P4). Las flechas indican las masas relativas correspondientes al patrón de migración electroforética. (n=3).





**Figura 24. La detección de SVCT2 es bloqueada específicamente por su péptido inhibitorio.**

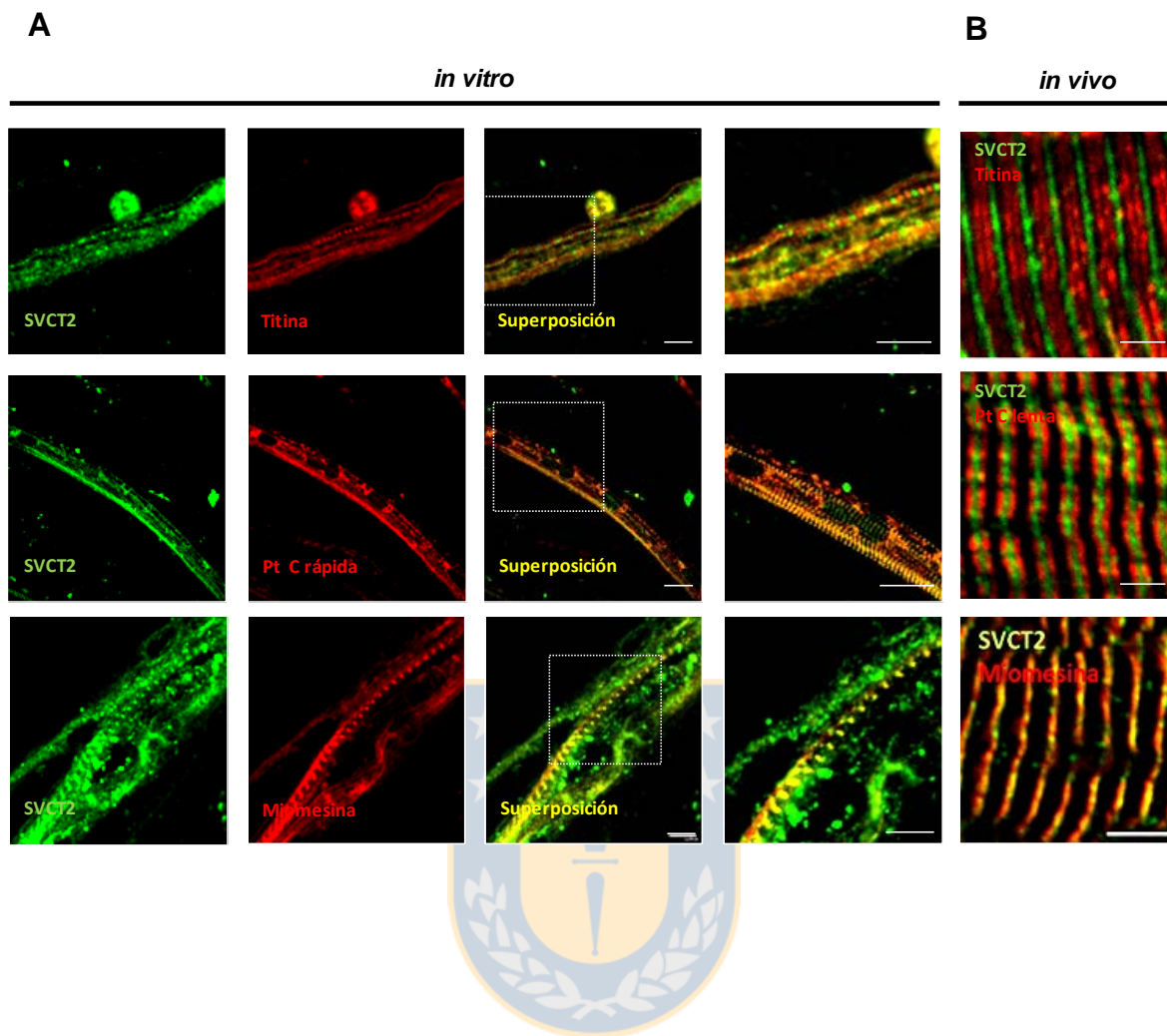
**A.** Expresión de SVCT2 en extracto total de LDA<sub>L</sub> y fracciones; extracto total (ET), sobrenadante inicial (S) y microsomas pesados (MP), sobrenadante 1 (S1), sobrenadante 2 (S2), pellet 3 (P3), sobrenadante 3 (S3) y pellet 4 (P4) (Panel superior). Comparación en la expresión de SVCT2 en extractos LDA, MP y S2 obtenidas a partir de protocolo fuerza iónica-detergente, en ausencia y presencia de péptido inhibitorio (*panel inferior*). **B.** Expresión de SVCT2 en LDA<sub>L</sub>, ET, S, MP, S1, S2, P3, S3 y P4 (*panel superior*). Comparación en la expresión de SVCT2 en extractos LDA<sub>L</sub>, MP y S2 obtenidas a partir de protocolo detergente-fuerza iónica, en ausencia y presencia de péptido inhibitorio (*panel inferior*). Las flechas indican las masas relativas correspondientes al patrón de migración electroforética.

fue realizada por una pre-incubación con un péptido inhibidor (PI) específico para SVCT2 (Figura 24A y B). Como control se realizaron ensayos de Western blot en la totalidad de las fracciones con el anticuerpo anti SVCT2 en ausencia de PI. Los resultados observados en la figura 23, indican que en ambos ensayos el péptido inhibidor bloqueó al anticuerpo anti SVCT2 apoyando la idea que la banda inmunorreactiva de 95 KDa corresponde efectivamente a SVCT2.

## 2.2. Localización subcelular de SVCT2 en miotubos de pollo

Considerando que la expresión de SVCT2 se restringe preferencialmente a fibras musculares lentas oxidativas *in vivo* y que la expresión a nivel de transcrito y proteína ha sido determinada recientemente por Low y col. (2010) *in vitro* en miotubos de pollos, nosotros propusimos evaluar la expresión y localización subcelular de SVCT2 durante la miogénesis *in vitro*. Para esto fueron realizados ensayos de inmunohistoquímica y Western blot a partir de cultivo de miotubos, obtenidos desde mioblastos embrionarios de pollo (HH 37) los cuales fueron mantenidos en medio de crecimiento y posteriormente incubados en medio de diferenciación por 4 días. Para los ensayos de inmunohistoquímica, los miotubos de pollo fueron fijados en metanol frío por 10 minutos e incubados con los anticuerpos anti SVCT2, titina, proteína C rápida y miomesina. Como se observa en la figura 25, SVCT2 presenta un patrón de distribución estriado transversal y co-localiza con miomesina. Por el contrario SVCT2 no co-localiza con titina y proteína C rápida, presentando un comportamiento similar a lo observado *in vivo*.

Con la finalidad de evaluar la localización de distintas proteínas musculares, incluida SVCT2, durante la etapa de estructuración de las fibras musculares, fueron realizados ensayos de Western blot a partir de mioblastos de pollos aislados y diferenciados a miotubos. Al día 4 de incubación en medio de diferenciación los miotubos fueron lisados y extraídas sus proteínas citosólicas y de membrana. Los extractos de proteínas citosólicas y de membrana fueron cargados y separados en geles de acrilamida-bisacrilamida al 10% p/v. Posteriormente fueron transferidas a membrana de PVDF e incubadas con los anticuerpos anti miomesina, bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa, proteína C rápida y SVCT2.



**Figura 25. SVCT2 se expresa en cultivos primarios de miotubos de pollo y se distribuye intracelularmente en forma similar a lo observado *in vivo*.**

**A.** Cultivos primarios de pollo al día 4 de diferenciación fueron co-incubadas con anticuerpos primarios anti SVCT2 y anti titina (*panel superior*), anti SVCT2 y anti proteína C rápida (*panel central*) y anti SVCT2 y miomesina (*panel inferior*) y revelados con anticuerpos anti IgG conjugado con Alexa Fluor 488 (verde) y Alexa Fluor 546 (rojo). Regiones delimitadas con líneas punteadas corresponden a las zonas magnificadas según corresponda. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **B.** Criosecciones longitudinales de músculo LDA<sub>L</sub> incubadas con anticuerpo primario anti SVCT2 y anti titina (*panel superior*), anti SVCT2 y anti proteína C rápida (*panel central*) y anti SVCT2 y miomesina (*panel inferior*). Magnificación de regiones de fibras musculares lentas co-incubadas con los anticuerpos primarios anti SVCT2, anti proteína C lenta, anti miomesina y anti titina y revelados con anticuerpos anti IgG conjugado con Alexa Fluor 488 (verde) y Alexa Fluor 546 (rojo). Barra 10  $\mu\text{m}$ .

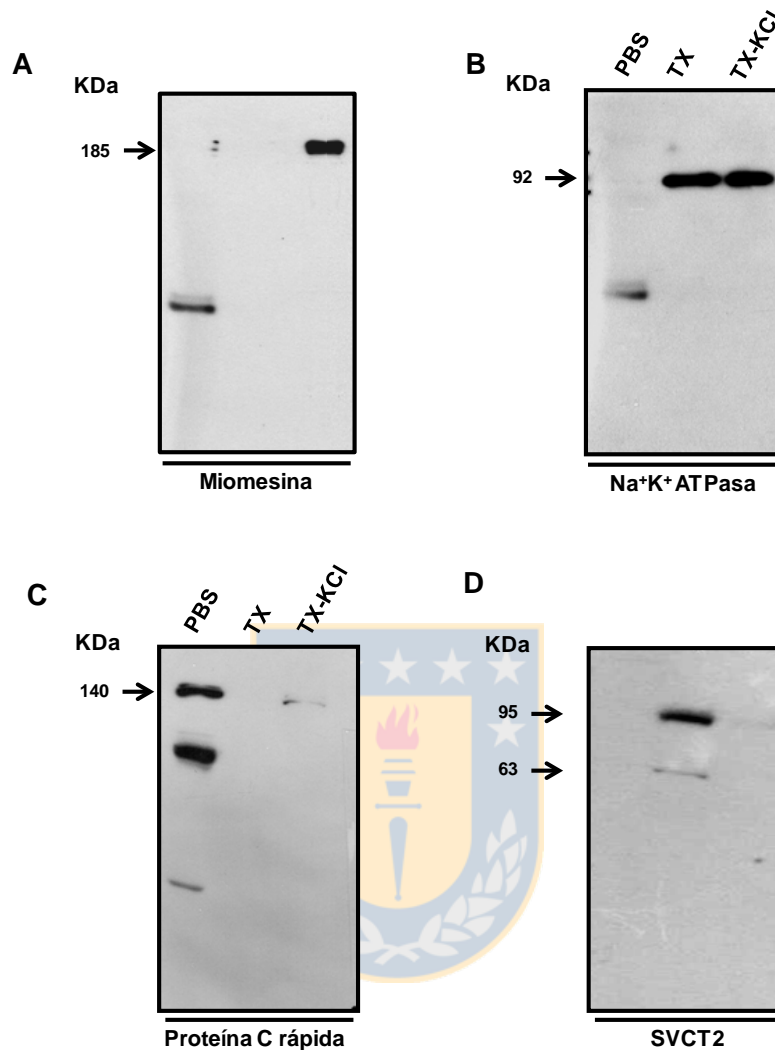
Miomesina fue detectada en la fracción TX-KCl como una banda inmunorreactiva de una masa molecular aproximada de 185 KDa (Figura 26A). La bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa fue detectada en los extractos TX y TX-KCl como un banda de 92 KDa (Figura 26B). La isoforma rápida de la proteína C fue identificada en el extracto PBS como una banda inmunorreactiva de 140 KDa (Figura 26C). SVCT2 fue localizado en el extracto TX mayoritariamente como una banda de 95 KDa y en menor proporción como una banda inmunorreactiva de 65 KDa (Figura 26D). Bandas inmunorreactivas inespecíficas para miomesina, bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa y proteína C rápida de aproximadamente 55 KDa fueron observadas en los ensayos de Western blot.

En su conjunto, las aproximaciones experimentales conducentes a determinar la localización subcelular de SVCT2 sugieren que el transportador se ubica a nivel del retículo sarcoplásmico durante la miogénesis embrionaria y en la etapa adulta.

Se ha propuesto por numerosos estudios que la expresión génica que define el fenotipo lento de las fibras musculares depende de la activación de vías de transducción señales específicas mediadas por calcio. Una forma controlada que permite la activación de genes específicos del fenotipo lento en condiciones *in vitro*, ha sido llevado a cabo con patrones de estimulación eléctrica de baja frecuencia (patrón lento). En este contexto, nosotros proponemos que la aplicación de pulsos eléctricos de baja frecuencia en fibras rápidas incrementará la expresión de SVCT2 resultando en la inducción de plasticidad muscular desde el fenotipo rápido al lento. Permitiendo de esta manera “*evaluar los niveles de expresión de SVCT2 in vitro en condiciones de inducción y/o mantención del fenotipo lento*”

### **3. Regulación de la expresión de SVCT2 en fibras aisladas y miotubos de ratón.**

Se ha demostrado que las fibras musculares lentas al ser depolarizadas se contraen lentamente como resultado de una menor actividad mATPasa. Por otro lado, se ha reportado la existencia de distintas ondas de liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico, siendo las de propagación lenta las necesarias para la activación de vías de señalización conducentes a regular la expresión génica que



**Figura 26. SVCT2 se expresa en miotubos de pollo y co-distribuye con Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa a nivel de la fracción enriquecida en proteínas de membrana.**

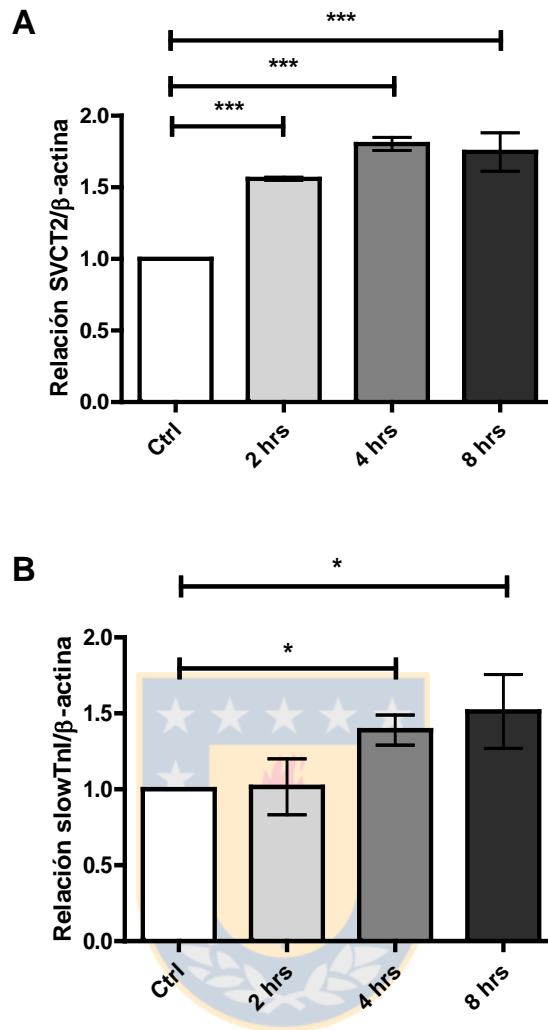
Análisis de expresión por Western blot de extractos enriquecidos en proteínas citosólicas y de membrana obtenidas a partir de miotubos de pollo al día 4 de diferenciación. **A.** Expresión de miomesina (10 µg). **B.** Expresión de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa subcelulares (10 µg). **C.** Expresión de proteína C rápida (10 µg). **D.** Expresión de SVCT2 (30 µg). Las flechas indican las masas relativas correspondientes al patrón de migración electroforética. (n=3).

definen el fenotipo en las fibras musculares. En este contexto, nosotros proponemos que la aplicación de estimulación eléctrica en pulsos de baja frecuencia inducirá la expresión de SVCT2 en fibras rápidas.

### **3.1. La depolarización de membrana inducida por electroestimulación aumenta la expresión de SVCT2 en fibras aisladas y miotubos de ratón**

Para evaluar el comportamiento de SVCT2 en células musculares, a nivel de ARNm en respuesta a una depolarización de membrana independiente de potasio, se realizaron ensayos de estimulación eléctrica en fibras aisladas y miotubos de ratón. Fibras musculares de ratones adultos BALB/c fueron aisladas del músculo rápido *Flexor digitalis brevis* (FDB) y mantenidas en cultivo. Posteriormente las fibras fueron estimuladas con un patrón lento de 20 Hz de frecuencia y extraído el RNA a distintos tiempos para realizar ensayos de qPCR utilizando partidores específicos para SVCT2 de ratón (Tabla 5). Como se muestra en la figura 27A, los niveles de transcrito de SVCT2 aumentan progresivamente en las fibras estimuladas. La cuantificación de los niveles de los productos de SVCT2 obtenidos, respecto a los niveles de  $\beta$ -actina, muestran un aumento desde un 56% a las 2 hrs hasta un 80% a las 4 hrs post-estimulación (n=3). Como control fue amplificado SVCT2 y normalizado en relación a  $\beta$ -actina en fibras aisladas que no fueron sometidas a estimulación eléctrica.

Con el propósito de establecer una correlación entre los niveles de ARNm de SVCT2 y un gen que responde a un patrón de estimulación lenta fueron realizados ensayos de qPCR para Troponina I lenta (TnIs). Como control fue amplificado TnIs en fibras aisladas que no fueron sometidas a estimulación eléctrica. Como se observa en la figura 27B, la estimulación con pulsos a 20 Hz de frecuencia incrementa progresivamente los niveles de transcrito para este gen, observándose un aumento del 39% a las 4 hrs y de un 51% a las 8 hrs respecto al control. No se observaron modificaciones en los niveles de transcrito a las 2 hrs post-estimulación (n=3).



**Figura 27. La expresión de SVCT2 es incrementada por la depolarización de membrana inducida por electroestimulación en fibras aisladas de ratón.**

**A.** Análisis de expresión del ARNm para SVCT2 por qPCR en fibras aisladas del músculo FDB de ratón adulto. Se extrajo RNA total de las fibras a las 2, 4, 8 hrs post-estimulación eléctrica (20 Hz de frecuencia), los cuales fueron transcritos a ADNc con transcriptasa reversa. Como control se amplificó actina de  $\beta$ -actina de ratón. **B.** Análisis de expresión de Troponina I lenta (TnIs) a las 2, 4 y 8 post-estimulación. Como control se amplificó  $\beta$ -actina de ratón. Como control interno experimental se utilizó RNA total obtenido de fibras FDB sin estimular. El análisis de expresión representa los valores de SVCT2 y TnIs normalizados con respecto a  $\beta$ -actina. (n=3).

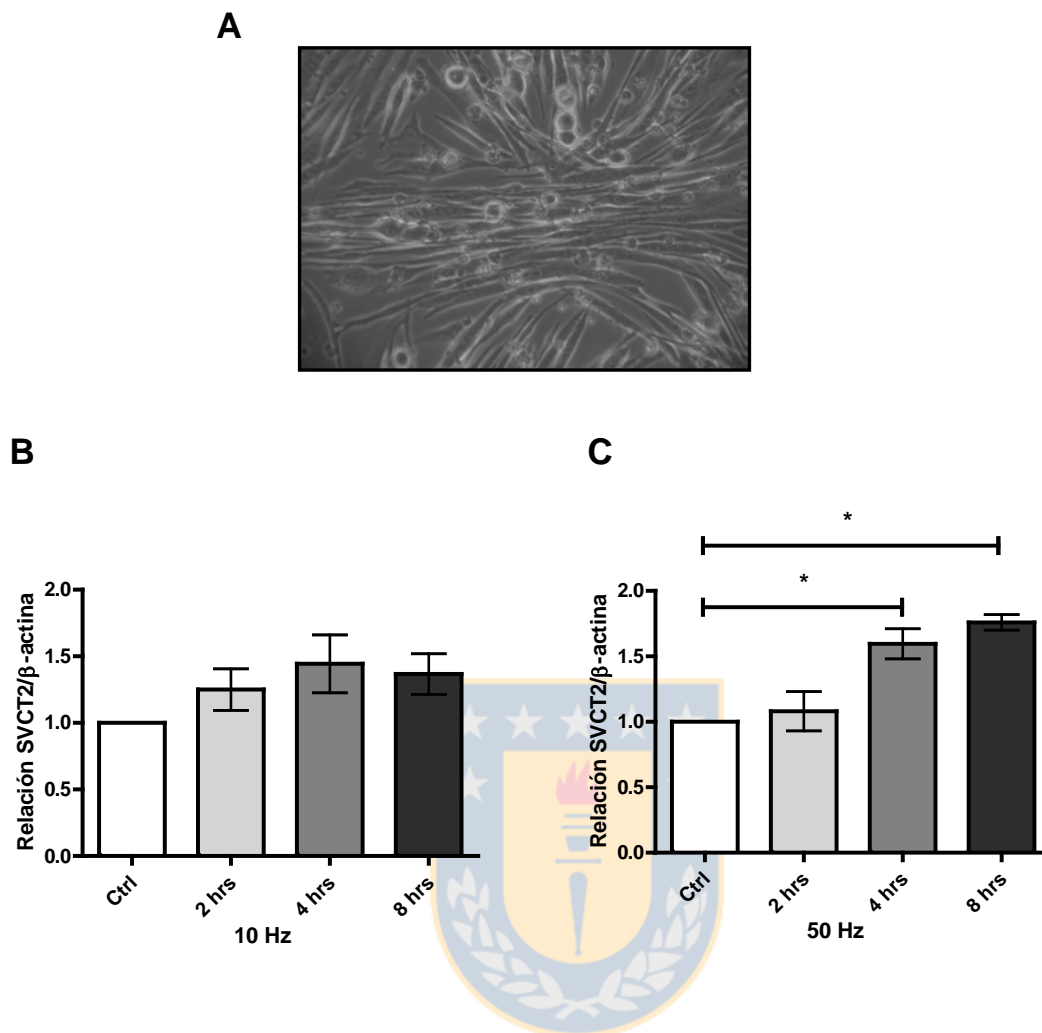


Para correlacionar el efecto de la depolarización de membrana en un sistema muscular inmaduro y de esta manera evaluar el potencial rol de la inervación sobre la expresión de SVCT2 durante la miogénesis, se procedió a evaluar por ensayos de qPCR la expresión del transportador en miotubos de ratón (Figura 28). El ARN de miotubos estimulados con patrones de 10 y 50 Hz fue extraído a las 2, 4 y 8 hrs post-estimulación. Los niveles de ARNm para SVCT2 aumentaron progresivamente en ambas condiciones a partir de las 2 hrs post-estimulación en 25% y 8% respectivamente. A las 4 hrs post-estimulación bajo un patrón de estimulación de 10 Hz los niveles de transcrito aumentaron a un 44% (Figura 28B). Por otro lado, la aplicación de 50 Hz elevó los niveles de transcrito a un 60% (Figura 28C). Los niveles de expresión para SVCT2 a las 8 hrs post-estimulación fueron de 37% y 76% bajo patrones de estimulación de 10 y 50 Hz respectivamente. Como control fue amplificado SVCT2 a partir de ARN de miotubos de ratón no estimulados eléctricamente. Los niveles de expresión fueron determinados en relación a los niveles de  $\beta$ -actina (n=3). En su conjunto, los resultados obtenidos en fibras musculares adultas y miotubos de ratón sugieren que la estimulación eléctrica induce un aumento en la expresión de SVCT2.

### **3.2. La depolarización de membrana inducida por electroestimulación altera la distribución de SVCT2 en fibras aisladas de ratón.**

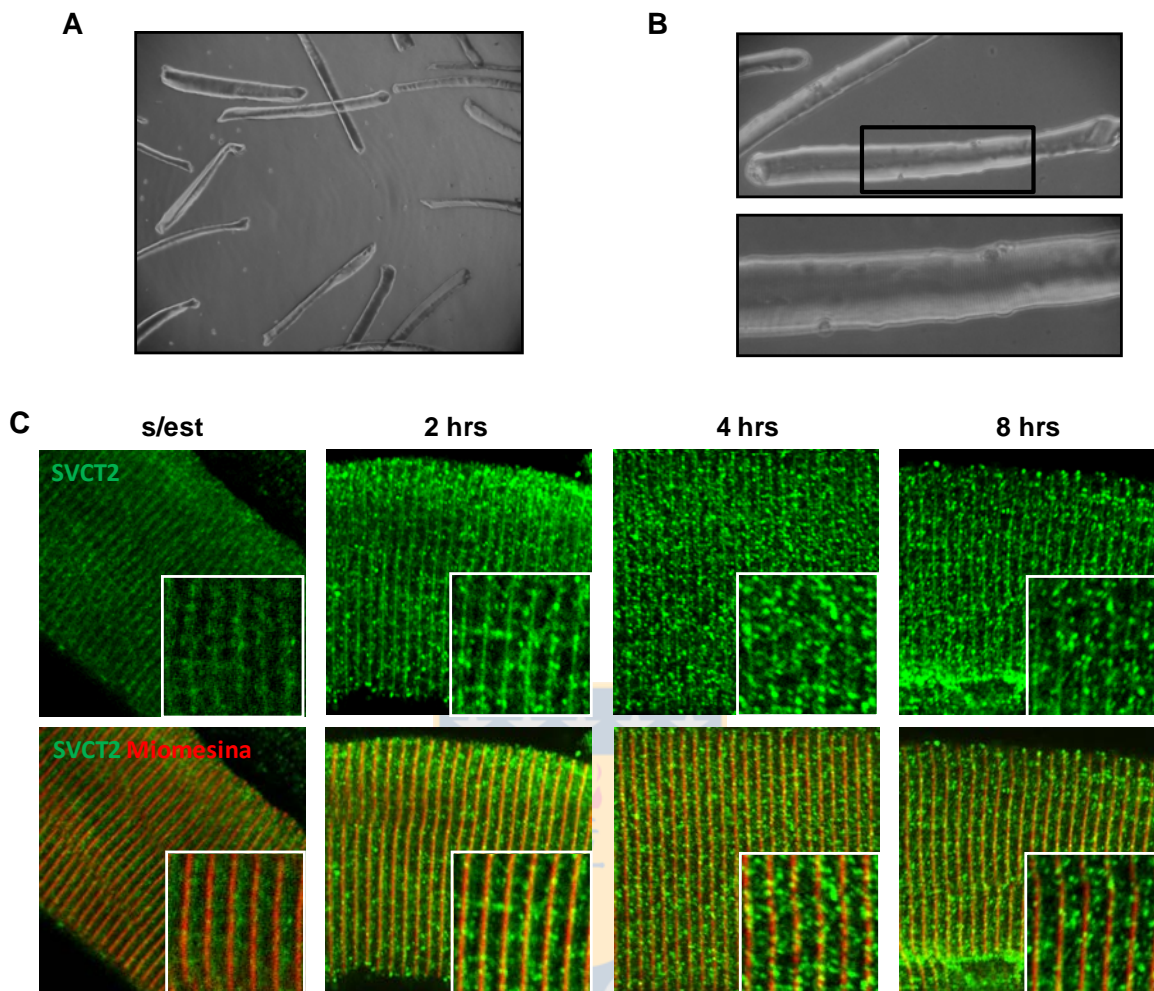
En el tejido muscular se ha observado que GLUT4 transloca en respuesta a insulina desde una localización intracelular en estructuras vesiculares a los túbulos transversos (Rodnick y cols., 1992). Con la finalidad de analizar la localización de SVCT2 en respuesta a un patrón de estimulación de baja frecuencia similar a la actividad de motoneuronas que inervan fibras lentas, fibras aisladas de ratón adulto fueron electroestimuladas a 20 Hz (Figura 29). La expresión del transportador fue determinada por ensayos de inmunohistoquímica con el anticuerpo anti SVCT2 y determinada su localización en la fibra muscular con respecto a la relación con miomesina utilizando el anticuerpo monoclonal anti miomesina. Como se observa en la figura 29C, entre las 2 y 4 hrs postestimulación





**Figura 28. La expresión de SVCT2 es incrementada por la depolarización de membrana inducida por electroestimulación en miotubos de ratón.**

**A.** Cultivo de miotubos de ratón al 4<sup>to</sup> día de diferenciación. **B.** Análisis de expresión de ARNm para SVCT2 por qPCR en miotubos de ratón. Se extrajo RNA total de las miotubos a las 2, 4, 8 hrs post-estimulación eléctrica (10 Hz de frecuencia), los cuales fueron transcritos a ADNc con transcriptasa reversa. Como control se amplificó actina de β-actina de ratón. **C.** Análisis de expresión de ARNm para SVCT2 por qPCR en miotubos de ratón. Se extrajo RNA total de las miotubos a las 2, 4, 8 hrs post-estimulación eléctrica (50 Hz de frecuencia), los cuales fueron transcritos a ADNc con transcriptasa reversa. Como control se amplificó β-actina de ratón. Como control interno experimental se utilizó RNA total obtenido de miotubos de ratón sin estimular. El análisis de expresión representa los valores de SVCT2 normalizados con respecto a β-actina. (n=3).

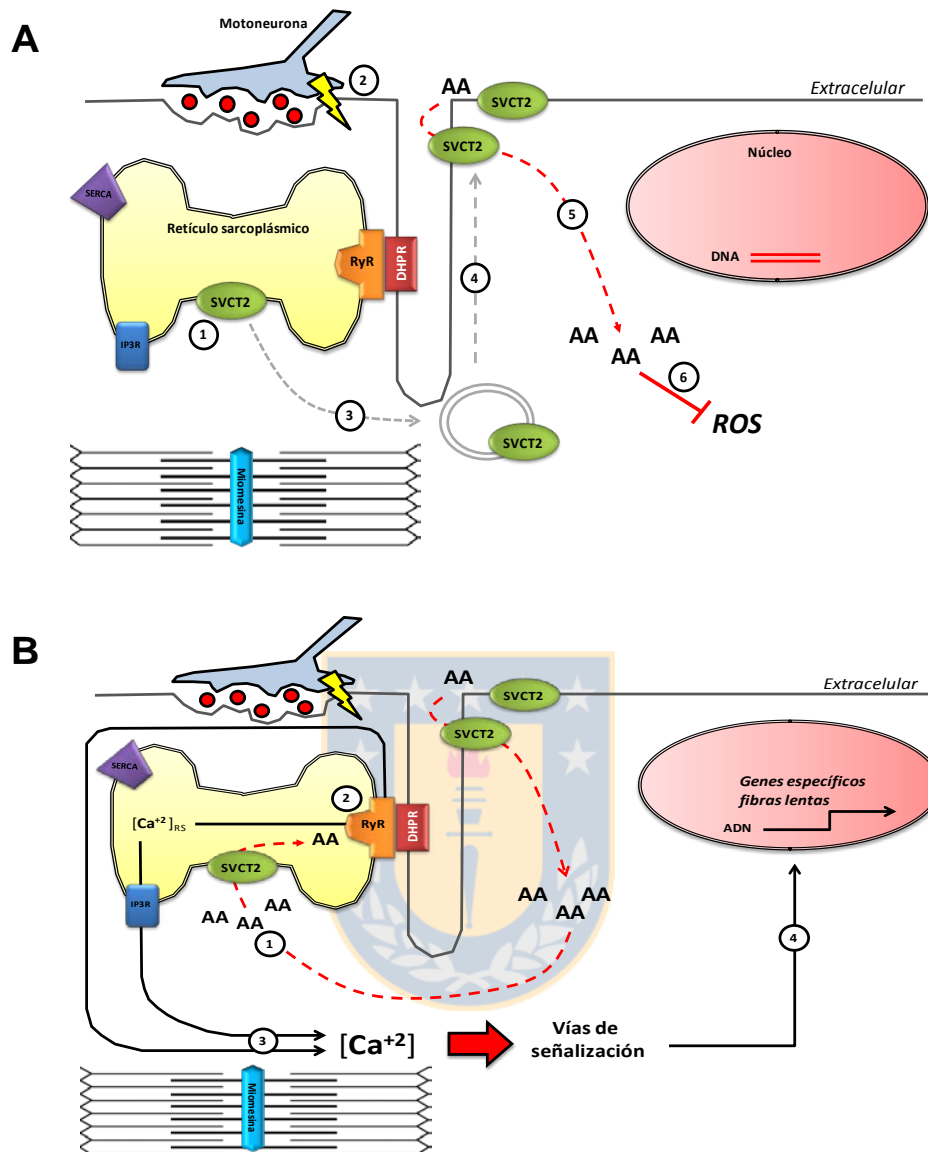


**Figura 29. SVCT2 altera su distribución intracelular en fibras musculares esqueléticas en respuesta a la depolarización de membrana inducida por electroestimulación.**

**A.** Cultivo de fibras aisladas del músculo FDB de ratón adulto. Barra 1 mm. **B.** Sección magnificada de una fibras musculare FDB. Barra 25  $\mu\text{m}$ . **C.** Fibras aisladas del músculo FDB de ratón adulto fueron estimuladas eléctricamente con 270 pulsos a 20 Hz de frecuencia y fijadas a las 2, 4, 8 hrs post estimulación. Las fibras fueron co-incubadas con los anticuerpos primarios anti SVCT2 y anti miomesina y revelados con anticuerpos anti IgG conjugados con Alexa Fluor 488 (verde) y Alexa Fluor 546 (rojo). Barra 5  $\mu\text{m}$ .

la expresión de SVCT2 aumentó en comparación a lo observado para la condición control. Además, se observaron acumulaciones focales de inmunorreactividad para SVCT2. A diferencia de lo observado anteriormente, a las 8 hrs post-estimulación la expresión de SVCT2 se observó disminuida y el patrón de distribución de las acumulaciones focales inmunorreactivas para SVCT2 se observaron más dispersas. Nuestros resultados muestran una concordancia entre los niveles de expresión del transportador observados en los ensayos de qPCR con un aumento de los niveles de expresión de la proteína a nivel de las fibras estimuladas. Por otro lado, se observó un cambio de su localización intracelular en respuesta a la depolarización sugiriendo la posibilidad de una reorganización intracelular del transportador con el propósito de suplir la demanda de vitamina C en las fibras musculares en condiciones que incrementan la síntesis de especies oxidativas (Figura 29C).

Considerando todos los resultados expuestos en este trabajo, podemos concluir que SVCT2 se expresa preferentemente en fibras musculares lentas oxidativas durante el desarrollo embrionario hasta la adultez. Además, nuestras aproximaciones experimentales permitieron determinar la localización subcelular del transportador a nivel del retículo sarcoplásmico en regiones cercanas a la línea M del sarcómero en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Finalmente, hemos establecido que la depolarización por estimulación eléctrica regula positivamente la expresión del transportador en fibras adultas y miotubos de ratón. Adicionalmente, nosotros observamos, que bajo estas condiciones SVCT2 puede redistribuirse en un patrón vesicular permitiéndole potencialmente localizarse a nivel del sarcolema e internalizando AA regulando del estado redox de las células musculares. Por otra parte, el AA podría ingresar al retículo sarcoplásmico modificando el estado redox y la funcionalidad de canales de calcio como el receptor de rianodina, produciendo la activación de vías de señalización dependientes de calcio que concluyen finalmente en la expresión de genes específicos del fenotipo lento (Figura 30).



**Figura 30.. Modelo propuesto para el ingreso de AA mediado por SVCT2 y la inducción y/o mantención del fenotipo lento en fibras musculares esqueléticas.**

**A.** SVCT2 se localiza subcelularmente, a nivel del retículo sarcoplásmico en relación topográfica a miomesina (1). La actividad de la motoneurona (2), induce una redistribución de SVCT2 en un patrón vesicular (3) y una potencial distribución hacia el sarcolema (4), permitiendo la internalización de AA (5). El ingreso de AA actuaría como un regulador eficiente de la oxidación intracelular (6). **B.** SVCT2 internaliza AA al retículo sarcoplásmico (1). El AA, modificaría el estado redox de canales como RyR (2), permitiendo la salida de  $Ca^{+2}$  al sarcoplasma (3) y la activación de vías de señalización dependientes de  $Ca^{+2}$ , induciendo la expresión de genes específicos del fenotipo lento (4).

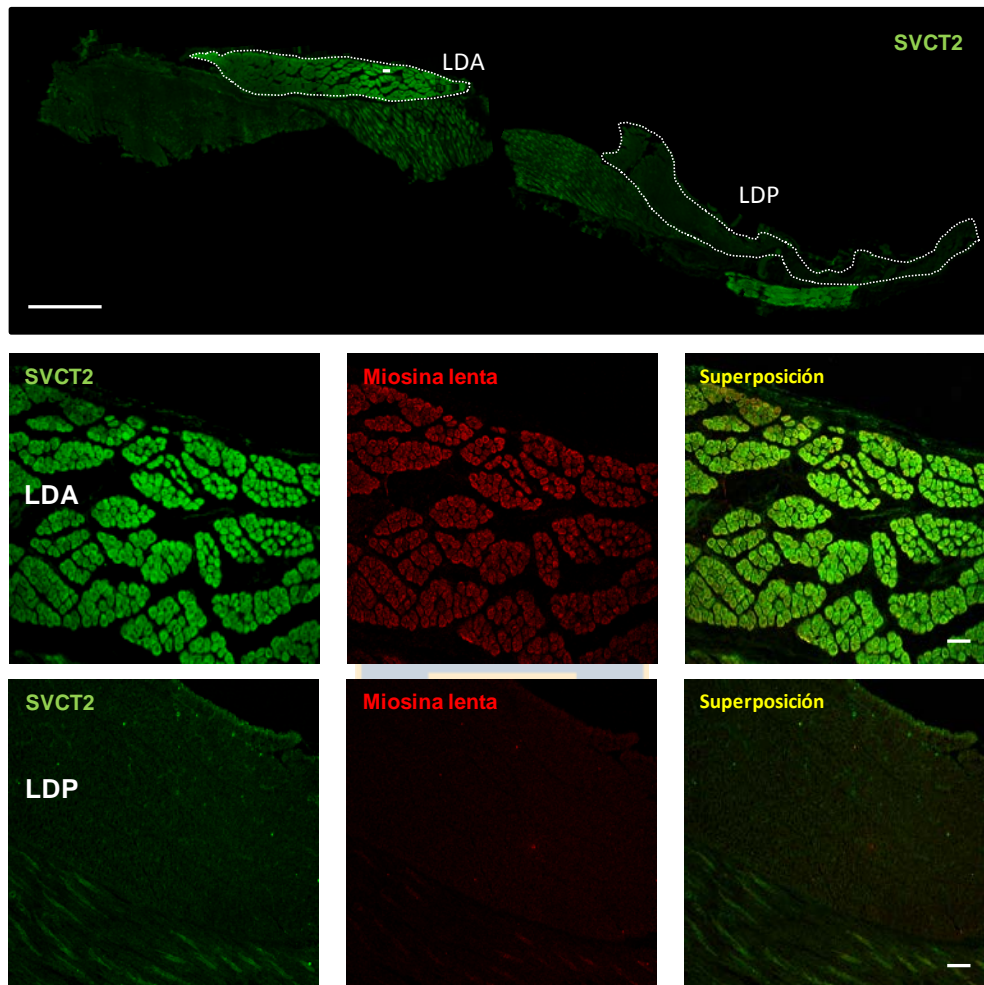
**VI. ANEXOS****Anexo 1**

**Anexo 1. Estandarización de cortes de músculo esquelético para inmunohistoquímica .**

<b>Espesor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Sustrato de adhesión</b>	<b>Resultado</b>
10	Vectabond®	Histología no conservada
15	Vectabond®	Histología regular
20	Vectabond®	Histología conservada en forma óptima



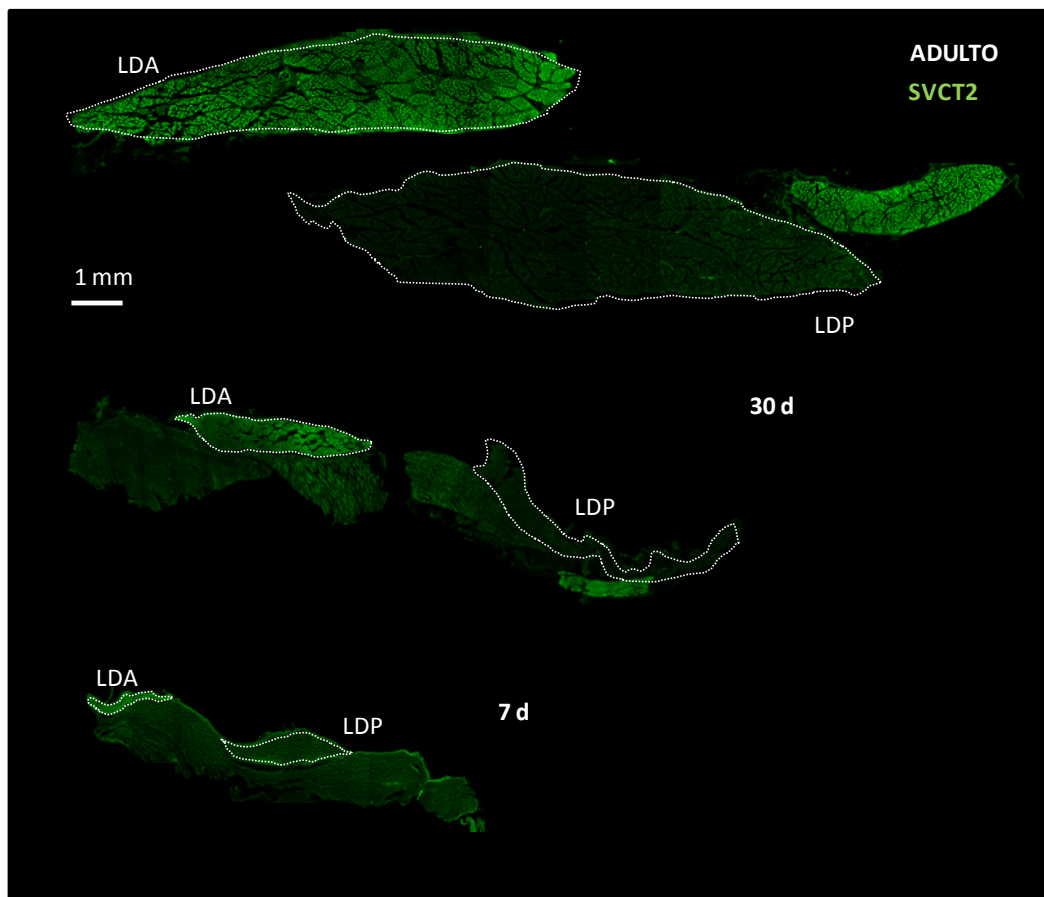
## Anexo 2



### Anexo 2. SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas durante el estadio post-natal temprano (30 días).

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones transversales de la musculatura dorsal de pollo post-natal (30 días). Las criosecciones fueron incubadas con un anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). Adicionalmente, las criosecciones fueron incubadas con anticuerpo primario anti miosina lenta y revelado con anticuerpo anti IgG acoplado a Alexa Fluor 546 (rojo) y ToPro3 (azul). Barra 1mm (*panel superior*). Barra 200  $\mu\text{m}$  (*panel intermedio e inferior*).

### Anexo 3



#### **Anexo 3. Expresión de SVCT2 durante el desarrollo post-natal de músculos de pollo.**

Análisis inmunohistoquímico de la localización de SVCT2 en criosecciones transversales de la musculatura dorsal de pollo a partir de los 7 días de edad hasta la adultez. Las criosecciones fueron incubadas con un primer anticuerpo primario anti SVCT2 y revelado con un anticuerpo anti IgG de cabra acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde). Barra 1 mm.



## VII. DISCUSIÓN

Inicialmente los estudios reportados en la literatura sobre el análisis de la expresión de los transportadores de sodio y vitamina C, no mostraron resultados positivos para la expresión de SVCTs en el tejido muscular esquelético. Es así como estudios realizados por Liang y cols. (2001) y Rajan y cols. (1999) en humanos y Tsukaguchi y cols (1999) en ratas no detectaron la expresión de SVCT2 en este tejido. Posteriormente, Kuo y cols. (2004) detectaron bajos niveles de transcrito para SVCT2 en el músculo esquelético de ratones. Así mismo en líneas celulares musculares L6C5 y C2C12 se determinó la expresión y funcionalidad sólo de SVCT2 (Savini y cols., 2005; Savini y cols., 2007). Aún cuando estos últimos estudios reconocían la existencia de este transportador, recientemente Low y cols. (2009) determinaron que el SVCT2 se expresa preferencialmente en fibras musculares esqueléticas del tipo I lento oxidativas en vertebrados. Sin embargo, hasta el inicio de esta tesis, no se había descrito el patrón de expresión para SVCT2 durante la etapa post-natal y cómo SVCT2 modularía la inducción y/o la definición del fenotipo muscular.

### **1. SVCT2 se expresa en músculos lentos de pollo adulto**

Con el propósito de evaluar la expresión del transportador en el músculo esquelético durante la etapa post-natal y la adultez, se procedió a realizar los ensayos de RT-PCR, Western blot e inmunohistoquímicos en músculos lentos y rápidos de pollo. Nuestro modelo experimental basado en la utilización de músculos de pollo, corresponde a un modelo que es ampliamente aceptado debido a que éstos han sido identificados y clasificados previamente siguiendo parámetros morfológicos, bioquímicos, funcionales y moleculares (Barnard y cols., 1982; Barnard y cols., 1971; Page, 1969; Spangenburg y Booth, 2003; te Pas y cols., 2004). Adicionalmente, se cuenta con una amplia variedad de anticuerpos monoclonales diseñados contra proteínas musculares estructurales y de membrana específicos de esta especie, lo que facilita su estudio y posterior interpretación.

Los resultados obtenidos por los ensayos de RT-PCR y Western blot determinaron que la expresión de SVCT2 durante la etapa adulta se restringe a músculos lentos. El fenotipo observado en este músculo es reflejo de la mayoritaria presencia de fibras musculares lentas que generan ATP a través del metabolismo oxidativo (Ashmore y Doerr, 1971; Barnard y cols., 1971; Pette y Staron, 1990). La expresión diferencial de SVCT2 en este músculo sugiere la presencia de un mecanismo especialmente adaptado que permitiría regular los niveles de vitamina C intracelular y de esta manera disminuir el potencial efecto nocivo de los agentes oxidantes sobre la integridad de las fibras. Por otra parte, la elevada actividad de otros mecanismos antioxidantes como SOD, GPX y catalasa refuerzan el concepto de que músculos lentos posean sistemas más activos para el control de especies oxidativas (Powers y cols., 1994; Powers y Jackson, 2008)

En el músculo esquelético como resultado del ejercicio o de la estimulación eléctrica se incrementan los niveles de especies oxidativas (Espinosa y cols., 2006; Reid y Durham, 2002). A la fecha, existe importante evidencia sobre el efecto negativo de estas moléculas oxidantes en las fibras musculares afectando tanto a la estructura de los miofilamentos (Burke y cols., 1976; Callahan y cols., 2001), la sensibilidad de los miofilamentos al calcio (Andrade y cols., 1998; Andrade y cols., 2001; Moopanar y Allen, 2005; Powers y Jackson, 2008), la actividad cinética de los miofilamentos por oxidación de sus constituyentes como las cadenas pesadas de miosina (MHC) y troponina C (Andrade y cols., 2001; Coirault y cols., 2007) y, adicionalmente, potenciando el efecto de la insensibilidad al calcio por parte de los músculos fatigados (Moopanar y Allen, 2005), además de su efecto sobre mitocondrias, estructuras de membrana y ADN (Davies y cols., 1982; Fan y cols., 2010; Powers y Jackson, 2008).

Si bien las especies oxidativas presentan un potencial efecto nocivo a nivel muscular cuando estos se encuentran en altas concentraciones, se ha demostrado que el  $H_2O_2$  modifica la función de diversas proteínas incluyendo quinasas y fosfatasas (Espinosa y cols., 2006) así como de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 en células C2C12 (Catani y cols., 2004; Zhou y cols., 2001). Por otra parte, diferentes estudios han determinado que la actividad de canales de

calcio como el receptor de rianodina (canal responsable de la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico al citoplasma), puede ser incrementada como respuesta a especies oxidativas endógenas como  $O_2^-$  (Eu y cols., 2000),  $H_2O_2$  (Favero y cols., 1995; Suzuki y cols., 1998) y GSH (Sun y cols., 2001; Zable y cols., 1997). Esto se debe a que de las cuatro subunidades homólogas que conforman el receptor, 50 de sus residuos de cisteína están en el estado reducido y entre 10 a 12 son altamente susceptibles a oxidación (Hidalgo, 2005; Hidalgo y cols., 2002; Hidalgo y cols., 2004; Sun y cols., 2001).

Considerando los antecedentes anteriormente descritos nosotros sugerimos que los altos niveles de SVCT2 observados en el músculo lento permiten aumentar la biodisponibilidad de vitamina C en las fibras musculares lentas tipo I y de esta manera contrarrestar la acción de especies reactivas generadas como parte de su metabolismo oxidativo durante la actividad física normal y en condiciones de ejercicio prolongado (Figura 30).

Concordante con los niveles de expresión de SVCT2 detectados por RT-PCR en el músculo LDA<sub>L</sub> adulto, el análisis de expresión de la proteína mostró una banda inmunorreactiva del tamaño esperado de 65 KDa, basado en el análisis de la secuencia primaria del transportador de pollo y lo observado durante la miogénesis (Low y cols., 2009). Esta masa molecular es similar a lo detectado en otras especies como rata y ratón, donde SVCT2 migra entre 65 y 75 KDa (Jin y cols., 2005; Mun y cols., 2006; Wu y cols., 2003a; Wu y cols., 2003b). La determinación de bandas inmunorreactivas para SVCT2 adicionales a la de 65 KDa de masas moleculares de 180, 95 y 53 KDa fue similar a lo observado por Low y cols., (2009) durante la miogénesis tardía de pollos.

Se han reportado variaciones en la masa molecular para el SVCT2 producto de N-glicosilación en neuronas de ratón y en células N2a que sobreexpresan SVCT2 de ratón (García M de y cols., 2005; Liang y cols., 2002; Salazar, 2010; Subramanian y cols., 2008; Tsukaguchi y cols., 1999) y fosforilación por proteína kinasa C (Daruwala y cols., 1999; Rajan y cols., 1999; Tsukaguchi y cols., 1999; Wang y cols., 1999; Wang y cols., 2000). Sin embargo, las modificaciones post-traduccionales del tipo N-glicosilación o fosforilación descritas para SVCT2 no

permiten explicar en su totalidad las variaciones en la masa molecular del transportador observadas en este estudio. Es así como ensayos con N-glicosidasa F disminuyen la masa molecular de SVCT2 desde 75 a 66 KDa en neuronas hipotalámicas de ratón (García M de Mde y cols., 2005) de forma similar en las células N2a desde 120 a 75 KDa (Salazar, 2010) y de 95 a 85 KDa en células HepG2 que sobreexpresan SVCT2 humano (Subramanian y cols., 2008). Las modificaciones observadas en la masa molecular para el SVCT2 podrían ser consecuencia de modificaciones post-traduccionales que no consideran a la N-glicosilación o fosforilación para este transportador en el tejido muscular de pollo.

Otras probables consideraciones respecto a las modificaciones en la masa molecular observadas para SVCT2 en el tejido muscular, corresponden a la formación de homooligómeros resistentes a condiciones denaturantes de la electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida, de forma similar a lo observado para el transportador de glutamato GLAST en cerebro de rata (Furuta y cols., 1997) y la isoforma muscular de creatina quinasa (Bantle y cols., 1996) y/o heterooligómeros entre la isoforma completa de SVCT2 y la isoforma corta con función dominante negativa (Lutsenko y cols., 2004).

Aún cuando es necesario realizar estudios más acabados para determinar la naturaleza de la bandas inmunorreactivas para SVCT2, estos resultados nos sugieren que en el tejido muscular de pollo se producen variaciones en la masa molecular de SVCT2 que podrían estar relacionadas con modificaciones post-traduccionales de SVCT2 o el establecimiento de interacciones con otras isoformas del transportador que regularía negativamente su función durante el desarrollo post-natal.

En relación al patrón de inmunoreactividad de SVCT2 en el tejido muscular de pollo adulto, este presentó una distribución intracelular, tal como ha sido descrito en neuronas y en células germinales (Angulo y cols., 2008; Caprile y cols., 2009). De forma interesante, su expresión se restringió preferencialmente a fibras tipo I reforzando el concepto de que los músculos con mayor abundancia de este tipo de fibras expresan SVCT2.

Los resultados obtenidos en esta sección de nuestro estudio nos permiten concluir que la expresión del transportador durante la adultez se circunscribe a músculos esqueléticos lentos de pollos y particularmente en fibras lentas oxidativas tipo I bajo un patrón intracelular de forma similar a lo observado por Low y cols. (2009) durante la miogénesis temprana de pollo, sugiriendo que tanto su expresión como su localización se mantiene en este tipo de fibras durante la etapa post-natal.

## **2. SVCT2 se expresa en el músculo esquelético durante el desarrollo post-natal temprano en pollos**

Las observaciones descritas por Low y cols. (2009) así como los resultados obtenidos en nuestro estudio han determinado que la expresión de SVCT2 se restringe a fibras musculares lentas durante el desarrollo embrionario y la adultez en músculos de pollo. Sin embargo, se desconoce cómo se comporta la expresión del SVCT2 durante el período en donde se establecen las principales características metabólicas que definen el fenotipo muscular.

La determinación de la actividad NADH-TR como indicador de la capacidad oxidativa, demostró una progresiva disminución en el número de las fibras oxidativas presentes en el músculo  $LDP_R$ . Estos resultados se relacionan con una paulatina adaptación metabólica de las fibras musculares hacia la vía glicolítica como fuente de ATP desde la etapa embrionaria tardía a la adultez. En este sentido, y en correlación con nuestros estudios, se ha demostrado que la cantidad de fibras lentas en el músculo rápido  $LDP_R$  de pollo declina conforme avanza el desarrollo post-natal (Ishimoto y cols., 1988; Khaskiye y cols., 1987; Toutant, 1982).

En forma paralela a las modificaciones de la actividad NADH-TR, también se observaron modificaciones morfológicas que incrementaron la masa muscular durante la etapa post-natal. Cabe señalar que durante el desarrollo de un músculo completamente diferenciado, el incremento de la masa total es producto tanto del crecimiento longitudinal y transversal como por la pérdida progresiva de tejido conectivo dentro del músculo (Shear y Goldspink, 1971). Se ha determinado que

durante la etapa post-natal el área de sección transversal (CSA) se incrementa en los músculos LDA<sub>L</sub> y LDP<sub>R</sub> de pollos como resultado de un aumento de los componentes contráctiles (miofibrillas) y no contráctiles (sarcoplásmicos) (Shear, 1978; te Pas y cols., 2004). En fibras jóvenes de ambos tipos durante el periodo post-natal, las proteínas contráctiles recién sintetizadas son ensambladas e incorporadas dentro de los miofilamentos pre-existentes. Ejemplo de esta condición son las miofibrillas pertenecientes a las fibras del músculo LDP<sub>R</sub> las cuales incorporan nuevos filamentos contráctiles permitiéndoles de esta manera a las fibras duplicar su tamaño y por ende aumentar progresivamente la masa muscular a medida que se avanza en el desarrollo (Shear, 1978)

Durante el desarrollo post-natal las fibras musculares modifican la expresión de proteínas, capacidad oxidativa y perfusión sanguínea mientras se adaptan a sus nuevas funciones, dependiendo del tipo de músculo, especie y raza (te Pas y cols., 2004). Puesto que la diferenciación de las fibras musculares es un proceso continuo durante el período post-natal dependiente de la expresión de proteínas específicas que definen el fenotipo muscular, el análisis de los perfiles de expresión de las proteínas musculares en extractos totales y de las isoformas lenta y rápida de la proteína C realizados en este estudio permite corroborar este fenómeno. Se ha determinado que durante este período, la cantidad de proteínas musculares es el reflejo del balance entre los procesos de síntesis y degradación intracelular (Doherty y cols., 2004; te Pas y cols., 2004). En este sentido, se ha determinado incrementos significativos en la expresión de proteínas en músculos rápidos de aves como glicógeno fosforilasa, albúmina,  $\beta$ -enolasa, aldolasa, GAPDH, lactato deshidrogenasa y fosfoglicerato mutasa (Doherty y cols., 2004; Doherty y cols., 2005)

El crecimiento y el desarrollo del músculo esquelético se relaciona con cambios secuenciales en la expresión de isoformas de proteínas contráctiles y regulatorias. Las modificaciones a nivel de proteínas contráctiles durante el desarrollo post-natal están directamente relacionadas con mantener la organización molecular del sarcómero. La diversidad de los niveles de estas proteínas puede sólo estar basada en el reemplazo de una isoforma por otra con

características estructurales y funcionales similares. Ejemplos de estos cambios secuenciales en los perfiles de expresión durante distintas etapas del desarrollo del músculo del pollo incluyen a troponina T (Reid y cols., 1989), cadenas livianas de miosina (MLC), tropomiosina (Miller y cols., 1985) y las cadenas pesadas de miosina siguiendo para esta última una progresión desde la isoforma embrionaria a neonatal (fetal) para finalizar en la expresión de la isoforma adulta (Bandman y Bennett, 1988; DiMario y Stockdale, 1997). La progresiva disminución en la expresión de la isoforma lenta de la Proteína C, concuerda plenamente con lo reportado en músculos rápidos (Obinata y cols., 1984) e igualmente los bajos niveles de expresión de la isoforma lenta a partir de la segunda semana de desarrollo. Sin embargo, la expresión de bajos niveles de las isoformas lentas y rápidas de proteína C en los músculos LDP<sub>R</sub> y LDA<sub>L</sub> respectivamente puede ser satisfactoriamente explicado considerando las observaciones en las cuales se determinó que ambas isoformas de la proteína C pueden ser co-expresadas dentro del mismo músculo e incluso dentro del mismo sarcómero (Ackermann y Kontogianni-Konstantopoulos, 2010; Reinach y cols., 1983). En consecuencia el análisis de expresión de las isoformas rápidas y lentas de proteína C nos permitió definir que durante el desarrollo post-natal se suceden modificaciones en la expresión de proteínas estructurales, lo que da cuenta del proceso adaptativo de las fibras musculares que definen su fenotipo durante este período del desarrollo.

Con respecto a la disminución progresiva de los niveles de expresión para SVCT2 en el período post-natal, nuestros resultados sugieren que los requerimientos intracelulares de vitamina C son mayores en músculos lentos que en rápidos, posiblemente como respuesta a la necesidad para regular los niveles de moléculas oxidantes producidas por estos músculos funcionalmente activos. En este sentido, se ha determinado que la expresión del transportador es modificada por efecto de agentes oxidantes directa o indirectamente a través de la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y depolarización con altas concentraciones de potasio en células C2C12 y en cultivos primarios de pollo (Low y cols., 2011; Savini y cols., 2007). Un hallazgo que le otorga un mayor grado de relevancia funcional a nuestros estudios es que durante la etapa embrionaria (miogénesis secundaria) los niveles de



SVCT2 son elevados (Low y cols 2009), permitiendo de esta manera relacionar directamente a la vitamina C en la inducción temprana de la miogénesis (Low y cols., 2010), en cambio a nivel post-natal regularían el estado redox de las fibras permitiendo la mantención del fenotipo lento.

### **3. SVCT2 se expresa en fibras musculares lentas oxidativas de pollo**

El patrón de inmunorreactividad para SVCT2 en tejido muscular de pollo presentó una distribución intracelular, tal como se ha determinado en otros tipos celulares como neuronas y células germinales de otras especies (Angulo y cols., 2008; Caprile y cols., 2009). Al respecto, en los diferentes estadios evaluados en este trabajo, SVCT2 presentó un patrón de co-localización con fibras que expresan miosina lenta y no con las que expresaron la isoforma rápida de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico, lo que demuestra la distribución preferencial del transportador en las fibras lentas tipo I de forma similar a lo observado durante el desarrollo embrionario (Low y cols., 2009). La utilización de estos anticuerpos monoclonales específicos contra miosina lenta han permitido identificar el contenido de fibras presentes en los músculos de pollo durante la etapa embrionaria (Crow y Stockdale, 1986; Kaprielian y Fambrough, 1987) y adulta (Miller y cols., 1985). En este sentido, se ha determinado que la expresión de diferentes tipos de miosinas en las masas musculares que forman las extremidades presentan un patrón de distribución espacial característico, que guía el futuro desarrollo del músculo y anticipan la futura composición de las fibras dentro del músculo (Crow y Stockdale, 1986). Es por esta razón que la distribución de las fibras musculares miosina lenta positiva observadas en este estudio sugiere que la definición del fenotipo lento del músculo  $\text{LDA}_L$  está en directa relación con las modificaciones a nivel metabólico y molecular observadas durante el desarrollo post-natal. La evaluación de otros músculos lentos y rápidos ubicados en regiones anatómicamente diversas permiten generalizar este concepto como un evento que ocurre en forma ubicua en el organismo.

Por otra parte, la determinación de inmunorreactividad para SVCT2 observada en fibras lentas en humanos, demuestra que no tan sólo esta distribución

preferencial se restringe al tejido muscular de pollo sino que es un fenómeno conservado entre especies.

#### **4. SVCT2 se localiza en dominios internos de membrana en fibras musculares lentas oxidativas de pollo y humano**

En las fibras musculares de aves los dominios internos de membrana presentan una organización estructural compleja. Sin embargo, están regularmente distribuidos en toda su extensión lo que permite identificar componentes estructurales en regiones específicas (Hikida, 1987). En virtud de estos antecedentes y con el propósito de determinar la localización subcelular de SVCT2, nosotros realizamos ensayos de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra el transportador y proteínas estructurales y de membrana en las fibras musculares lentas oxidativas de pollo. Los resultados determinaron que SVCT2 se distribuye intracelularmente bajo un patrón estriado transversal en toda la longitud de la fibra muscular.

Considerando tanto las características estructurales descritas para SVCT2 en relación a la existencia de 12 dominios transmembrana (Faaland y cols., 1998; Liang y cols., 2001) así como la ausencia de inmunorreactividad para SVCT2 a nivel del sarcolema y la inmunorreactividad para el receptor de rianodina observada en secciones longitudinales de los músculos LDA<sub>L</sub>, nos permiten sugerir que SVCT2 se localiza presumiblemente a nivel del retículo sarcoplásmico.

Con la finalidad de realizar un estudio más detallado de la distribución de SVCT2 a nivel de las fibras musculares, se realizó un análisis de las intensidades de fluorescencia en secciones definidas de las fibras en las cuales se realizaron ensayos de inmunolocalización. Este procedimiento nos permitió determinar que SVCT2 se localiza a nivel de las regiones centrales del retículo sarcoplásmico, debido a su relación con el receptor de rianodina localizado mayoritariamente en las cisternas terminales cercanas a la línea Z del sarcómero (Airey y cols., 1990) y al centro del sarcómero, por la relación topográfica con miomesina una proteína de la línea M.

La miomesina corresponde a una proteína estructural de 185 KDa que se une fuertemente a los componentes de la línea M del sarcómero permitiendo el ensamblaje y mantención de las miofibrillas a través de la estabilización de miosina y titina dentro del sarcómero a nivel de la banda A (Eppenberger y cols., 1981; Lange y cols., 2005). La cercanía topográfica entre SVCT2 y miomesina podría ser consecuencia del entramado generado entre miomesina y otras proteínas sarcoméricas como miosina y titina permitiendo 2 posibles fenómenos: 1) estabilización de SVCT2 dentro de la región del retículo sarcoplásmico longitudinal y 2) la contención de SVCT2 en estructuras vesiculares constituidas por membrana en el espacio definido entre el retículo sarcoplásmico longitudinal y los miofilamentos.

Por otra parte, el análisis inmunohistoquímico reveló que no existe una relación topográfica de SVCT2 y titina a nivel sarcomérico. Titina corresponde a la proteína estructural del sarcómero de mayor extensión ( $> 1 \mu\text{m}$  de longitud) ubicada entre las líneas Z y M (Skeie, 2000). En miofibrillas relajadas, titina se localiza a nivel de la unión entre las bandas A e I, resultando en un doblete de inmunorreactividad por sarcómero (Wang y Greaser, 1985). Sin embargo, la distancia entre los dobletes en sarcómeros sucesivos puede variar según al grado de contracción miofibrillar (Wang y Greaser, 1985). Nuestras observaciones corroboran estos antecedentes identificando a titina a nivel de la banda I y permitiendo definir la localización de SVCT2 en la zona de inmunorreactividad negativa para titina ubicada en el centro del sarcómero.

El patrón inmunorreactivo para uno de los filamentos intermedios presentes en el músculo como desmina, permitió determinar morfológicamente la extensión del sarcómero de pollo y definir la segregación de SVCT2 en la región central del sarcómero. En las fibras musculares, desmina se organiza como una red filamentosa cuya función es unir lateralmente las miofibrillas individuales a sus líneas Z e interconectar los sarcómeros al sarcolema (Li y cols., 1997; Shah y cols., 2004). De esta manera desmina se considera como un marcador inequívoco de la línea Z del sarcómero.

Finalmente, para complementar la determinación de la localización de SVCT2 en el interior de las fibras musculares en la región central del sarcómero y su relación con proteínas sarcoméricas (Figura 17), se utilizaron los anticuerpos contra la isoforma lenta de la proteína C y miosina lenta. La proteína C, se localiza en la región central del sarcómero en cada hemi sección de la banda A (Reinach y cols., 1983). Esta proteína permite unir secciones de meromiosina pesada y meromiosina liviana de miofilamentos de miosina adyacentes y los subfragmentos-2 (subfragmento derivado de la proteólisis de meromiosina pesada) y actina (Reinach y cols., 1983). De esta manera forma un andamiaje y por ende una estabilización estructural a los miofilamentos de miosina presentes en la banda A. El patrón de inmunoreactividad para la isoforma lenta de la proteína C observado en nuestro estudio reveló un patrón de doblete a nivel de la banda A. El uso de miosina lenta como marcador sarcomérico estructural permitió en conjunto con la proteína C la delimitación de la banda A del sarcómero, dejando circunscrita la localización de SVCT2 a nivel de la zona central de esta, es decir a la región de la línea M, definida por el espacio entre los dobletes de la proteína C lenta y la región central de miosina.

En su conjunto, la utilización de anticuerpos monoclonales contra proteínas estructurales del sarcomero como titina, proteína C lenta, miomesina, desmina y miosina y de proteínas de membrana como el receptor de rianodina, nos permiten sugerir la localización subcelular de SVCT2 en la zona central del sarcómero de fibras musculares lentas oxidativas tipo I a nivel del retículo sarcoplásmico en cercanía con la línea M del sarcómero, como resultado de la relación topográfica con el receptor de rianodina y miomesina respectivamente. De forma interesante, este patrón de organización intracelular también fue observado en fibras lentas de humano sugiriendo un alto grado de homología entre estas especies en su localización.

Con la finalidad de resolver la localización de SVCT2 en las fibras musculares, se realizaron ensayos de fraccionamiento subcelular que permitieron separar fracciones enriquecidas en distintos dominios internos de membrana. Es importante señalar que el fraccionamiento subcelular ha permitido determinar la

localización de proteínas de membrana y estructurales del músculo esquelético como GLUT-1 (Agote y cols., 2001), GLUT-4 (Agote y cols., 2001; Muñoz y cols., 1995a; Muñoz y cols., 1995b), GLUT-5 (Agote y cols., 2001), receptor de rianodina (Airey y cols., 1990; Hoffman y cols., 1987; Percival y cols., 1994), bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico (Hoffman y cols., 1987; Muñoz y cols., 1995b), DHPR (Muñoz y cols., 1995a; Muñoz y cols., 1995b), distrofina (Brenman y cols., 1995; Ervasti y cols., 1991; Hoffman y cols., 1987; Muñoz y cols., 1995b), subunidad  $\beta 1$ -integrina (Muñoz y cols., 1995a; Muñoz y cols., 1995b), bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa (Agote y cols., 2001), receptor de insulina (Muñoz y cols., 1995b), SCAMPs (secretory carrier membrane protein) 37 y 39 (Muñoz y cols., 1995b), proteína específica de túbulos transversos (tt28) (Muñoz y cols., 1995a; Muñoz y cols., 1995b), óxido nítrico sintasa (Brenman y cols., 1995; Chao y cols., 1996), titina, miosina, nebulina y calsecuestrina (Hoffman y cols., 1987), sintrofina y sarcoglican (Chao y cols., 1996) y espectrina (Brenman y cols., 1995) en músculos de conejo, ratón, rata y pollo. Por lo cual esta es considerada una técnica debidamente validada para identificar la localización de las distintas proteínas musculares.

Con el procesamiento inicial de los músculos con bajas concentraciones de NaCl (100 mM) fue posible colectar una fracción de microsomas pesados (estructuras vesiculares de membrana formadas artificialmente). En cuanto a la expresión de SVCT2 en esta fracción de membranas obtenidas, nuestros resultados demostraron un enriquecimiento de una banda inmunoreactiva de una masa molecular aproximada de 95 KDa con respecto a lo observado en el extracto de proteínas totales de  $\text{LDL}_L$ . Si bien la masa molecular descrita para el transportador correspondería a 63 KDa, variaciones en su masa han sido reportadas. En este sentido, la determinación del SVCT2 por ensayos de Western blot como una banda inmunoreactiva de 95 KDa en células HepG2 que sobreexpresan SVCT2 humano (Subramanian y cols., 2008) avalan nuestros resultados. La utilización de un péptido inhibitorio derivado de la secuencia interna de SVCT2 de rata en los ensayos de Western blot, nos permitió comprobar que este anticuerpo reconoce a la banda de 95 KDa como SVCT2 lo que concuerda

adicionalmente con las masas moleculares descritas para SVCT2 en otros tipos celulares.

La localización de SVCT2 fue determinada junto con otras proteínas asociadas a membrana como la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico, el receptor de dihidropiridina y la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa en la fracción de microsomas pesados. Estos resultados concuerdan directamente, con lo reportado para la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico y receptor de rianodina a nivel de la fracción de microsomas desde músculos de ratón y pollo, respectivamente (Airey y cols., 1990; Hoffman y cols., 1987; Muñoz y cols., 1995b). Considerando estos antecedentes, nosotros concluimos que proteínas presentes tanto en el retículo sarcoplásmico como a nivel de los túbulos transversos y otras vesículas se encuentren en esta fracción, como es el caso del receptor de dihidropiridina y el receptor de insulina (Agote y cols., 2001; Muñoz y cols., 1995a).

Por otra parte, bajos niveles de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico, el receptor de dihidropiridina y la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa en el homogenizado inicial refuerza el concepto del enriquecimiento como resultado del fraccionamiento subcelular.

En el músculo esquelético la localización de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa ha sido determinada por ensayos inmunohistoquímicos en el sarcolema a nivel de la línea Z y M de los sarcómeros a los cuales se encuentra unidas a través de la interacción con  $\beta$ -espectrina,  $\alpha$ -foldrina y ankirina 3 (Williams y cols., 2001). Ensayos de fraccionamiento de membrana en músculos esqueléticos de mamíferos han permitido avalar estos resultados localizando preferencialmente a esta bomba a nivel del sarcolema y en menor proporción en los túbulos transversos (Agote y cols., 2001; Hundal y cols., 1994).

En el caso del receptor de dihidropiridina, diferentes estudios lo han localizado a nivel de fracciones enriquecidas en sarcolema y túbulos transversos (Muñoz y cols., 1995a; Muñoz y cols., 1995b). Bajo nuestras condiciones experimentales, la determinación del receptor de dihidropiridina en la fracción de microsomas pesados concuerda directamente con estas observaciones. De forma

similar al receptor de dihidropiridina, la determinación de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico fue localizada a nivel de los microsomas (Hoffman y cols., 1987; Muñoz y cols., 1995b).

La forma en que las proteínas asociadas a membrana como el receptor de dihidropiridina, la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico y la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa y particularmente SVCT2 se comportan en el fraccionamiento segregando en las fracciones microsomas pesados y el sobrenadante S2 de ambos protocolos, podría ser explicado debido a su conformación estructural, lo que impide la acción de detergentes no-iónicos como Tritón X-100, disminuyendo su solubilización (Bronner y Kleinzeller, 1979). Por otra parte, la acción de alta fuerza iónica (500 mM de NaCl) utilizados en nuestro estudio, permitiría solubilizar las proteínas contenidas en las estructuras de membrana formadas durante el fraccionamiento, tal como ha sido descrito para la óxido nítrico sintasa (Brenman y cols., 1995).

Finalmente, la localización de proteínas asociadas al citoesqueleto como miomesina y actina en los extractos totales, en el sobrenadante S y a nivel de los microsomas pesados, sugieren una solubilización parcial como resultado de una liberación incompleta desde otras proteínas musculares a los cuales se mantienen unidas, tal como se ha reportado entre miomesina y miosina (Reinach y cols., 1983).

Los resultados obtenidos del fraccionamiento en conjunto con los ensayos inmunohistoquímicos sugieren la localización de SVCT2 en regiones de membrana correspondientes al retículo sarcoplásmico de fibras lentas oxidativas. Es importante señalar que el retículo sarcoplásmico corresponde al principal reservorio intracelular de calcio en el músculo esquelético y que su liberación desde este organelo, además de ser importante para el proceso de contracción muscular, permite estimular la expresión de genes específicos del fenotipo muscular (Kaisto y Metsikkö, 2003).

La expresión de genes en fibras musculares ha sido relacionada con la activación de vías de transducción de señales dependientes de calcio que inducen la transición fenotípica de las fibras musculares desde el tipo rápido al lento (Liu y



cols., 2005; McCullagh y cols., 2004). En este sentido, se ha descrito que el aumento de calcio intracelular permite la activación de calcineurina y posteriormente del factor de transcripción NFAT induciendo la expresión de proteínas contráctiles lentas como las cadenas pesadas de miosina y troponina I (Chin y cols., 1998; Spangenburg y Booth, 2003). De forma similar, se ha reportado que aumentos en los niveles de calcio intracelular activan a calmodulina quinasa y ésta al factor de transcripción MEF2, permitiendo la expresión de genes lentos (Spangenburg y Booth, 2003).

Considerando aspectos tan importantes como la potente acción antioxidante descrita para la vitamina C, la localización de SVCT2 a nivel del retículo sarcoplásmico determinada por nuestros ensayos y los niveles de especies oxidativas que permiten regular diversas proteínas, entre ellos el principal canal de calcio a nivel de la fibra como el receptor de rianodina (Hidalgo y cols., 2004) y factores de transcripción específicos (Catani y cols., 2004), sugerimos que la expresión de SVCT2 y su localización posterior a nivel del retículo sarcoplásmico podría tener un rol durante el proceso de *plasticidad muscular*, permitiendo activar la expresión de genes específicos del fenotipo lento en aves como en mamíferos, incluyendo el humano, durante el período post-natal (Figura 30).

### **5. SVCT2 se expresa *in vitro* en miotubos de pollos**

Se ha reportado que en condiciones *in vitro*, los mioblastos de pollo se diferencian al fenotipo rápido independientemente del músculo del cual fueron extraídos y esta condición sólo puede ser revertida cuando toman contacto con motoneuronas (DiMario y Stockdale, 1997; Jordan y cols., 2003) o bajo patrones de estimulación eléctrica específicos (Crew y cols., 2010). En este contexto, nosotros realizamos la determinación de la expresión y localización de SVCT2 en miotubos de pollo por medio de ensayos de inmunolocalización y Western blot. Nuestras observaciones indicaron que durante el proceso de diferenciación, SVCT2 se expresa en miotubos rápidos de pollo y se distribuye intracelularmente

bajo el mismo patrón estriado transversal de forma similar a las fibras musculares *in vivo*.

Considerando estos resultados, nosotros sugerimos que SVCT2 es expresado en miotubos rápidos con la finalidad de incrementar la capacidad antioxidante contra moléculas reactivas producidas durante la diferenciación muscular (Musaro y cols., 2010; Vettor y cols., 2009), tales como las especies oxidativas derivadas del oxígeno, que son generados principalmente a nivel mitocondrial desde el complejo NAD(P)H (Malinska y cols., 2011) y por los especies oxidativas derivadas del nitrógeno producidas por la óxido nítrico sintasa (Reid y Durham, 2002) o posiblemente relacionarse con un potencial efecto en la internalización de vitamina C durante la miogénesis (Low, 2010; Low y cols., 2011).

Respecto a rol de vitamina C durante la diferenciación muscular se ha indicado que, concentraciones crecientes de vitamina C inducen en células C2C12 un incremento tanto en su área, como en el número de núcleos (indicador de fusión) (Low, 2010). Por otra parte, se han reportado importantes antecedentes respecto a la posible función de la vitamina C como un factor inductor de la miogénesis demostrando que la fusión de las células musculares L6 se favorece bajo tratamiento con una forma estable de ascorbato (ácido ascórbico 2 fosfato, AA2P) (Mitsumoto y cols., 1994). De forma similar, se ha demostrado que la vitamina C por separado o en conjunto con factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) inducen la expresión de miogenina y las cadenas pesadas de miosina, potenciando de esta manera la capacidad de los mioblastos a fusionarse (Shima y cols., 2011).

Con la finalidad de complementar nuestras observaciones en cuanto a la localización de SVCT2 en los miotubos de pollo, nosotros realizamos adicionalmente ensayos de Western blot a partir de extractos de proteínas citosólicas y de membrana. Interesantemente y en forma concordante con los resultados obtenidos *in vivo*, en criosecciones longitudinales de LDA<sub>L</sub>, detectamos que SVCT2 segrega en la fracción de proteínas de membrana (fracción TX). Estos resultados nos permiten concluir que tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*,

SVCT2 se localiza a nivel de dominios internos de membrana de las células musculares.

Es importante señalar que, coincidentemente con el proceso de alineamiento y fusión de los mioblastos para formar miotubos, comienza la expresión de proteínas características del músculo esquelético. Durante este período, se ha descrito que la expresión de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa se incrementa en alrededor de 20 veces con respecto a los niveles observados en mioblastos, para posteriormente localizarse a nivel del sarcolema (Wolitzky y Fambrough, 1986). En este sentido, la localización de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa, a nivel de la fracción de proteínas asociadas a membrana obtenidas en nuestros ensayos de Western blot nos permiten corroborar este fenómeno. Sin embargo, su detección a nivel de la fracción de proteínas insolubles (fracción TX- KCl) estaría explicado por sus características estructurales, debido a que esta tiene la particularidad de unirse a proteínas estructurales de las líneas Z y M del sarcómero (Williams y cols., 2001).

La detección de los marcadores estructurales del sarcómero como miomesina y la isoforma rápida de la proteína C en la fracción insoluble, demuestra que este procedimiento permite recuperar a las proteínas citosólicas y de membrana de las restantes proteínas presentes en los miotubos. La localización de la isoforma rápida de la proteína C a nivel de la fracción de proteínas citosólicas podría ser explicado en virtud de su activa biosíntesis durante el transcurso de la diferenciación de los miotubos (Obinata y cols., 1984).

Con respecto a la localización de SVCT2 en miotubos diferenciados, se debe considerar la estructuración del retículo sarcoplásmico. Durante la miogénesis el retículo sarcoplásmico se genera a partir de proyecciones vesiculares desde el retículo endoplásmico. A medida que el miotubo se desarrolla, las proyecciones vesiculares se dirigen en varias direcciones y finalmente coalescen en estructuras vesiculares de mayor tamaño alrededor o adyacentes a la banda I y a la línea Z de las miofibrillas (Ezerman y Ishikawa, 1967; Rossi y cols., 2008). Posteriormente, durante el proceso de diferenciación, la distribución de proteínas como la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo

sarcoplásmico y el receptor de rianodina se hace evidente en regiones específicas del retículo sarcoplásmico (Jorgensen y cols., 1977). Es así como dentro de los 6 primeros días de diferenciación se produce una reorganización de estas proteínas en el retículo sarcoplásmico longitudinal para el caso de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico y del receptor de rianodina a nivel de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico de unión (Cusimano y cols., 2009). Nuestros ensayos han podido determinar que la localización subcelular de SVCT2 se restringe a nivel del retículo sarcoplásmico longitudinal en los miotubos de pollo, lo que sugiere que, al igual que los miotubos de mamíferos, el retículo sarcoplásmico se ensambla y reorganiza sus proteínas constituyentes durante los primeros días de su diferenciación.

Por otra parte, considerando el modelo del desarrollo y reorganización de las proteínas del retículo sarcoplásmico descrito recientemente (Rossi y cols., 2008), la localización intracelular de SVCT2 en la fibra muscular podría ser resultado de una mayor afinidad a las regiones centrales del retículo sarcoplásmico longitudinal, de manera similar a lo descrito para la bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico en fibras musculares de pollo (Tillack y cols., 1974) y ratón (Kaakinen y cols., 2008). Finalmente, el grado de relación topográfica entre SVCT2 con miomesina observado *in vitro* nos permite concluir que tanto la expresión como su localización dentro del retículo sarcoplásmico longitudinal *in vitro* es un evento temprano en el desarrollo muscular y que su posicionamiento definitivo se mantiene sin variaciones aparentes durante el desarrollo *in vitro* e *in vivo* en las células musculares diferenciadas.

## **6. La expresión de SVCT2 es modificada por patrones de estimulación eléctrica**

La expresión de SVCT2 a partir de etapas tempranas de la miogénesis observada *in vitro* por Low y cols., (2009), así como *in vivo* en nuestro estudio, demostrado por la segregación preferencial a las fibras musculares lentas oxidativas sugieren que este transportador está relacionado con la definición del fenotipo muscular desde etapas tempranas del desarrollo y potencialmente con la

internalización de AA para el control de los niveles de moléculas oxidativas generadas por la actividad física.

A nivel muscular se ha determinado que la actividad física incrementa los niveles de agentes oxidantes y estimula mecanismos antioxidantes en el músculo lento (Palomero y Jackson, 2010). Recientemente, Low y cols. (2011) han determinado que la expresión de SVCT2 es incrementada durante el proceso de diferenciación e interesantemente como respuesta a la depolarización con altas concentraciones de  $K^+$  en miotubos de pollo. En este contexto, se ha observado que la depolarización de membrana en miotubos regula un número aproximado de 400 genes, incluyendo el factor de transcripción NFAT (Valdés y cols., 2008) e isoformas lentas de troponina I (Juretic y cols., 2007), IL-6 (interleuquina 6)(Carrasco y cols., 2003), Hsp70 y Hmox-1 (Jorquera y cols., 2009) e isoformas lentas y rápidas de la troponina I en fibras aisladas de ratón (Casas y cols., 2010).

La expresión de genes específicos en el músculo esquelético es consecuencia de la activación transcripcional de vías dependientes de calcio como NFAT y MEF2. Al respecto, el análisis *in silico* del promotor de SVCT2 de pollo determinó la presencia de sitios consenso para los factores de transcripción NFAT y MEF2 (Low, 2010) y demostró que la expresión de SVCT2 es inducida por depolarización con  $K^+$  en miotubos de pollo, sugiriendo que la expresión del transportador puede ser regulada positivamente en respuesta a depolarización de membrana. Es por esta razón, que se procedió a evaluar la expresión de SVCT2 bajo patrones de estimulación eléctrica que permiten la transición fenotípica rápida a lenta.

La plasticidad muscular rápida a lento en el tejido muscular ha sido inducida experimentalmente como respuesta a la estimulación eléctrica (Close, 1965; Pette y Vrbová, 1985) y particularmente con patrones de baja frecuencia (10 Hz) (Berchtold y cols., 2000). Nuestros resultados han demostrado que la expresión de SVCT2 es incrementada en fibras aisladas de ratón siguiendo un patrón similar a la expresión de la isoforma lenta de la Troponina I. La aplicación de pulsos eléctricos de baja frecuencia (20 Hz) a fibras aisladas de ratón aumentan los niveles de expresión de Troponina I (Casas y cols., 2010). Por otro lado en

miotubos de ratón la depolarización de membrana inducida por estimulación eléctrica indujo un incremento en los niveles de expresión de SVCT2. Es por esta razón que nosotros podemos concluir en base a nuestros resultados que la depolarización de membrana inducida por estimulación eléctrica induce la expresión de SVCT2 y otros genes lentos en las fibras musculares como parte del proceso de plasticidad muscular *in vitro*.

### **7. La localización subcelular de SVCT2 es modificada en respuesta a depolarización eléctrica**

El músculo esquelético posee un rol fundamental en la mantención de la homeostasis de glucosa en el organismo (Hashiramoto y James, 2000; Ploug y cols., 1998). En relación a esto el transporte de glucosa a través de la membrana es mediado por miembros tejido específicos de la familia de transportadores facilitativos de glucosa, siendo GLUT4 la principal isoforma presente en el músculo esquelético (Ploug y cols., 1998)

De forma interesante, los GLUTs, como se ha mencionado anteriormente, también participan en la internalización de vitamina C, bajo su forma oxidada ácido dehidroascórbico (Rumsey y cols., 2000; Rumsey y cols., 1997). A diferencia de lo observado para otras isoformas que se localizan a nivel del sarcolema, GLUT4 se localiza intracelularmente en estructuras tubulovesiculares y estructuras asociadas a la red *trans*-Golgi (Dombrowski y cols., 1996; Ploug y cols., 1998; Rodnick y cols., 1992). Se ha demostrado que la vesículas que contienen GLUT-4 translocan y se fusionan con la membrana plasmática a nivel de los túbulos transversos en respuesta a insulina o ejercicio (Marette y cols., 1992; Rodnick y cols., 1992), lo que incrementa la entrada de glucosa al músculo esquelético para cubrir su demanda energética.

Con el propósito de determinar los niveles de expresión y localización de SVCT2, bajo condiciones que inducen la transición fenotípica rápida a lenta, fibras musculares aisladas de ratón adulto fueron estimuladas con un patrón eléctrico de 20 Hz de frecuencia (Casas y cols., 2010). Nuestras observaciones determinaron que asociado con el incremento en la expresión de SVCT2 a nivel de ARNm, se

observó un incremento de SVCT2 a nivel de proteína. Este fenómeno fue similar a lo observado por Low y cols., (2011) en miotubos de pollo depolarizados con altas concentraciones de  $K^+$ . En forma interesante y paralelamente, al incremento en los niveles de expresión, se observó una redistribución de la localización subcelular de SVCT2 en las fibras estimuladas bajo un patrón de aspecto vesicular. Para evaluar la relevancia de nuestros resultados se debe considerar en primera instancia que el retículo sarcoplásmico corresponde a un subdominio del retículo endoplásmico (Ezerman y Ishikawa, 1967; Nori y cols., 2004; Volpe y cols., 1992) y que proteínas como calsecuestrina pueden movilizarse entre el retículo sarcoplásmico y el complejo de Golgi para ser modificadas por N-glicosilación y finalmente localizarse en su posición definitiva, a nivel de las cisternas terminales (Nori y cols., 2001).

Estos resultados abren la posibilidad de un mecanismo de tráfico para SVCT2 desde dominios internos de membrana hacia el sarcolema facilitando con ello la disponibilidad de vitamina C (Figura 30). Estas observaciones nos permite cuestionarnos sobre los posibles mecanismos celulares involucrados en esta redistribución de SVCT2, la naturaleza de las estructuras vesiculares en las cuales potencialmente son movilizadas y además de su rol a nivel del retículo sarcoplásmico en donde SVCT2 podría acumularse y eventualmente translocar al sarcolema como respuesta a estímulos específicos como depolarización bajo patrones de estimulación eléctrica.

Una probable explicación a la redistribución de SVCT2 inducido por la estimulación eléctrica, consideraría que el transportador incrementaría su expresión y posteriormente se localizaría en estructuras vesiculares que potencialmente pueden translocar hacia otras localizaciones intracelulares como el complejo de Golgi para ser modificados post-traduccionalmente o a nivel del sarcolema para facilitar la internalización de vitamina C como respuesta a los niveles de especies oxidativas que son generados en las fibras lentas producto de su metabolismo oxidativo (Figura 30).



## VIII. CONCLUSIONES

En este estudio determinamos la expresión de SVCT2 durante la etapa post-natal del desarrollo muscular de pollo, donde se distribuye preferencialmente en fibras lentas oxidativas. Adicionalmente, hemos correlacionado la modificación de los niveles de expresión de SVCT2 con el incremento del tamaño de las fibras musculares, la proporción de fibras con metabolismo oxidativo y la expresión de las isoformas lenta y rápida de una proteína estructural del sarcómero como parte de las características morfológicas, metabólicas y moleculares que definen el fenotipo muscular. Nuestros resultados sugieren, aún cuando SVCT2 se mantiene particularmente elevado en las fibras musculares lentas oxidativas su expresión disminuye el transcurso de la vida post-natal.

Por otra parte, los estudios de inmunolocalización como fraccionamiento subcelular nos permitieron circunscribir la localización del transportador a dominios internos de membrana correspondientes a las regiones central del retículo sarcoplásmico en relación topográfica a la línea M del sarcómero.

Finalmente, abordamos la posible relación causa-efecto entre la expresión de SVCT2 y el fenotipo muscular por medio de ensayos de estimulación eléctrica en miotubos y fibras aisladas adultas. Observamos que en respuesta a una estimulación eléctrica que induce la modificación del fenotipo muscular rápido hacia uno lento, la expresión de SVCT2 se incrementa y sufre una redistribución de su patrón de localización subcelular. Esto sugiere que el músculo esquelético incrementa la expresión de SVCT2 con la finalidad de incorporar AA en condiciones normales de actividad y durante la transición plástica desde un fenotipo muscular rápido-glicolítico a uno lento-oxidativo en donde es necesaria debido a la alta tasa de generación de especies oxidativas. Por ello, la expresión de SVCT2 en el contexto del tejido muscular podría comportarse como un mecanismo adaptativo contra el estrés oxidativo de forma similar a lo observado para otros tejidos (Figura 30).

Los hallazgos de mayor relevancia en este trabajo consideran:

- SVCT2 se expresa en músculos lentos durante la etapa embrionaria tardía, post-natal temprana y la adultez en aves
- SVCT2 se expresa preferencialmente en fibras musculares lentas oxidativas en un patrón intracelular en forma conservada entre aves y humano.
- SVCT2 se localiza a nivel subcelular en la región central del retículo sarcoplásmico longitudinal *in vitro* e *in vivo*.
- La expresión de SVCT2 es positivamente regulada durante la transición fenotípica rápido a lenta en fibras musculares adultas.
- La localización de SVCT2 sufre una reorganización subcelular como respuesta a la modificación plástica del fenotipo.
- La expresión de SVCT2 podría ser una consecuencia del proceso de plasticidad muscular, permitiendo incorporar AA a fin de controlar las especies oxidativas generadas por la actividad física.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Ackermann, M., and Kontrogianni-Konstantopoulos, A. (2010). Myosin Binding Protein-C Slow: An Intricate Subfamily of Proteins. *J Biomed Biotechnol* 2010: 652065.

Agote, M., Goya, L., Ramos, S., Alvarez, C., Gavete, M., Pascual-Leone, A., and Escrivá, F. (2001). Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E1101-E1109.

Airey, J., Beck, C., Murakami, K., Tanksley, S., Deerinck, T., and Sutko, J. (1990). Identification and Localization of Two Triad Junctional Foot Protein Isoforms in Mature Avian Fast Twitch Skeletal Muscle. *J Cell Biochem* 265, 14187-12194.

Andrade, F., Reid, M., Allen, G., and Westerblad, H. (1998). Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physio* 509, 565-575.

Andrade, F., Reid, M., and Westerblad, H. (2001). Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *FASEB* 15, 309-311.

Angulo, C., Castro, M.A., Rivas, C.I., Segretain, D., Maldonado, R., Yanez, A.J., Slebe, J.C., Vera, J.C., and Concha, I. (2008). Molecular identification and functional characterization of the vitamin C transporters expressed by Sertoli cells. *J Cell Physiol* 217, 708-716.

Aruoma, O. (1994). Free radicals and antioxidant strategies in sport. *J. Nutr. Biochem* 5, 370-381.

Ashmore, C.R., and Doerr, L. (1971). Comparative Aspects of Muscle Fiber Types in Different Species. *Exp Neurol* 31, 408-418.

Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62, 315-333.

Baar, K., Wende, A.R., Jones, T.E., Marison, M., Nolte, L.A., Chen, M., Kelly, D.P., and Holloszy, J.O. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 16, 1879-1886.

Bandman, E., and Bennett, T. (1988). Diversity of fast myosin heavy chain expression during development of gastrocnemius, bicep brachii, and posterior latissimus dorsi muscles in normal and dystrophic chickens. *Dev Biol* 130, 220-231.

Banerjee, A.K., Mandal, A., Chanda, D., and Chakraborti, S. (2003). Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem* 253, 307-312.

Bánhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskás, F., and Mandl, J. (1997). Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Rad Biol Med* 23, 793 – 803.

Bantle, S., Keller, S., Haussmann, I., Auerbach, D., Perriard, E., Mühlebach, S., and Perriard, J.C. (1996). Tissue-specific Isoforms of Chicken Myomesin Are Generated by Alternative Splicing. *J Biol Chem* 271, 19042-19052.

Barnard, E.A., Lyles, J.M., and Pizzey, J.A. (1982). Fibers types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy. *J Physiol* 331, 333-354.

Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Furukawa, T., and Peter, J.B. (1971). Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am J Physiol* 220, 410-414.

Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75, 19-37.

Berchtold, M.W., Brinkmeier, H., and Muntener, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80, 1215-1265.

Bilan, P.J., Mitsumoto, Y., Maher, F., Simpson, I.A., and Klip, A. (1992). Detection of the GLUT3 facilitative glucose transporter in rat L6 muscle cells: regulation by cellular differentiation, insulin and insulin-like growth factor-I. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1129-1137.

Biondi, C., Pavan, B., Dalpiaz, A., Medici, S., Lunghi, L., and Vesce, F. (2007). Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. *Mol Hum Reprod* 13, 77-83.

Biressi, S., Molinaro, M., and Cossu, G. (2007). Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev Biol* 308, 281-293.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Braun, L., Puskás, F., Csala, M., Mészáros, G., Mandl, J., and Bánhegyi, G. (1997). Ascorbate as a substrate for glycolysis or gluconeogenesis: evidence for an interorgan ascorbate cycle. *Free Rad Biol Med* 23, 804 - 808.

Brenman, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K., and Bredt, D.S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743-752.

Bronner, F., and Kleinzeller, a., eds. (1979). *Current topics in membranes and transport* (New York).

Brooke, M.H., and Kaiser, K.K. (1969). Some comments on the histo-chemical characteristics of muscle adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 17, 431-432.

Bryson-Richardson, R.J., and Currie, P.D. (2008). The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet* 9, 632-646.

Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 16, 525-532.

Buller, A.J., Eccles, J.C., and Eccles, R.M. (1960). Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol* 150 417-439.

Burke, M., Reisler, F., and Harrington, W.F. (1976). Effect of bridging the two essential thiols of myosin on its spectral and actin-binding properties. *Biochemistry* 15, 1923-1927.

Callahan, L., Nethery, D., Stofan, D., DiMarco, A., and Supinski, G. (2001). Free Radical-Induced Contractile Protein Dysfunction in Endotoxin-Induced Sepsis *Am J Respir Cell Mol Biol* 24, 210-217.

Capellmann, M., Becka, M., and Bolt, H.M. (1994). A note on distribution of human plasma levels of ascorbic and dehydroascorbic acid. *J Physiol Pharmacol* 45 183-187.

Caprile, T., Salazar, K., Astuya, A., Cisternas, P., Silva, C., Montecinos, H., Millan, C., García M de, L., and Nualart, F. (2009). The Na<sup>+</sup> dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. *J Neurochem* 108, 563-577.

Carr, A.C., and Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr* 69 1086-1107.

Carrasco, M.A., Riveros, N., Ríos, J., Müller, M., Torres, F., Pineda, J., Lantadilla, S., and Jaimovich, E. (2003). Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am J Cell Physiol* 284, C1438-C1447.

Carver, F.M., Shibley, I.A., Jr. , Pennington, J.S., and Pennington, S.N. (2001). Differential expression of glucose transporters during chick embryogenesis. *Cell Mol Life Sci* 58, 645-652.

Casas, M., Figueroa, R., Jorquera, G., Escobar, M., Molgó, J., and Jaimovich, E. (2010). IP3-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 136, 455–467.

Castro, T., Low, M., Salazar, K., Montecinos, H., Cifuentes, M., Yanez, A.J., Slebe, J.C., Figueroa, C.D., Reinicke, K., de los Angeles Garcia, M., y cols. (2008). Differential distribution of the Sodium-vitamin C cotransporter-1 along the proximal tubule of the mouse and human kidney. *Kidney Int* 74, 1278-1286.

Catani, M.V., Savini, I., Duranti, G., Caporossi, D., Ceci, R., Sabatini, S., and Avigliano, L. (2004). Nuclear factor kappaB and activating protein 1 are involved in differentiation-related resistance to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Rad Biol Med* 37, 1024-1036.

Ciciliot, S., and Schiaffino, S. (2010). Regeneration of Mammalian Skeletal Muscle: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Current Pharmaceutical Design* 16, 906-914.

Clarkson, P., and Thompson, H. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? . *The American Journal of Clinical Nutrition* 72, 637S–646S.

Close, R. (1965). Effects of cross-union of motors nerves to fast and slow skeletal muscle. *Nature* 206, 831-832.

Coirault, C., Guellich, A., Barbry, T., Samuel, J., Riou, B., and Lecarpentier, Y. (2007). Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1009-H1017.

Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A., and Morgan, J.E. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122, 289-301.

Crew, J.R., Falzari, K., and DiMario, J.X. (2010). Muscle fiber type specific induction of slow myosin heavy chain 2 gene expression by electrical stimulation. *Exp Cell Res* 316, 1039-1049.

Criswell, D., Powers, S., Dodd, S., Lawler, J., Edwards, W., Renshler, K., and Grinton, S. (1993). High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity *Med Sci Sports Exerc* 25, 1135–1140.

Crow, M., and Stockdale, F.E. (1986). Myosin expression and specialization among the earliest muscle fibers of the developing avian limb. *Developmental Biology* 113, 238-254.

Cusimano, V., Pampinella, F., Giacomello, E., and Vincenzo Sorrentino, V. (2009). Assembly and dynamics of proteins of the longitudinal and junctional sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle cells. *PNAS* 106, 4695-4700.

Chao, D.S., Gorospe, J., Brenman, J.E., Rafael, J., Peters, M., Froehner, S., Hoffman, E., Chamberlain, J., and Bredt, D.S. (1996). Selective Loss of Sarcolemmal Nitric Oxide Synthase in Becker Muscular Dystrophy. *J Exp Med* 184, 609-618.

Chin, E.R., Olson, E.N., Richardson, J.A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J.M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12, 2499-2509.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Daruwala, R., Song, J., Koh, W.S., Rumsey, S.C., and Levine, M. (1999). Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett* 460 480-484.

Davies, K.J., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., and Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise *Biochem Biophys Res Commun* 107, 1198-1205.

Demirel, H.A., Powers, S.K., Naito, H., Hughes, M., and Coombes, J.S. (1999). Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J Appl Physiol* 86, 1002-1008.

Dhoot, G.K., and Perry, S.V. (1979). Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature* 278, 714-718.

DiMario, J.X., and Stockdale, F.E. (1997). Both myoblast lineage and innervation determine fiber type and are required for expression of the slow myosin heavy chain 2 gene. *Dev Biol* 188, 167-180.

Doerge, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H.G., and Schurmann, A. (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* 359, 443-449.



Doherty, M.K., McLean, L., Hayter, J.R., Pratt, J.M., Robertson, D.H., El-Shafei, A., Gaskell, S.J., and Beynon, R.J. (2004). The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics* 4, 2082-2093.

Doherty, M.K., Whitehead, C., McCormack, H., Gaskell, S.J., and Beynon, R.J. (2005). Proteome dynamics in complex organisms: Using stable isotopes to monitor individual protein turnover rates. *Proteomics* 5, 522-533.

Dombrowski, L., Roy, D., Marcotte, B., and Marette, A. (1996). A new procedure for the isolation of plasma membranes, T tubules, and internal membranes from skeletal muscle. *Am J Physiol* 270, E667-676.

Duarte, T., and Lunec, J. (2005). Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research* 39, 671-686.

Dubowitz, V., and Brooke, M.H. (1973). *Muscle Biopsy: A Modern Approach*.

Dubowitz, V., and Newman, D.L. (1967). Change in enzyme pattern after crossinnervation of fast and slow skeletal muscle. *Nature* 214, 840-841.

Ďuračková, Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol Res* 59, 459-469.

Duxson, M.J., Usson, Y., and Harris, A.J. (1989). The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development* 107, 743-750.

Eldridge, C.F., Bunge, M.B., Bunge, R.P., and Wood, P.M. (1987). Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation. *J Cell Biol* 105, 1023-1034.

Englard, S., and Seifter, S. (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr* 6, 365-406.

Eppenberger, H., Perriard, J.C., Rosenberg, U., and Strehler, E. (1981). The Mr 165,000 M-protein Myomesin: A Specific Protein of Cross-striated Muscle Cells. *J Cell Biol* 89, 185-193.

Ervasti, J., Kahal, S., and Campbell, K. (1991). Purification of dystrophin from skeletal muscle. *J Biol Chem* 266, 9161-9165.

Espinosa, A., Leiva, A., Peña, M., Müller, M., Debandi, A., Hidalgo, C., Carrasco, M.A., and Jaimovich, E. (2006). Myotube Depolarization Generates Reactive Oxygen Species Through NAD(P)H Oxidase; ROS-Elicited Ca<sup>2+</sup> Stimulates ERK, CREB, Early Genes. *J Cell Physiol* 209, 379-388.

Eu, J.P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J.S., and Meissner, G. (2000). The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. *Cell* 102, 499-509.

Evans, W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 72, 647S-652S.

Ezerman, E., and Ishikawa, H. (1967). Differentiation of the sarcoplasmic reticulum and T system in developing chick skeletal muscle in vitro. *J Cell Biol* 35, 405-420.

Faaland, C.A., Race, J.E., Ricken, G., Warner, F.J., Williams, W.J., and Holtzman, E.J. (1998). Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and *Aspergillus* nucleobase transporters. *Biochim Biophys Acta* 1442, 353-360.

Fan, X., Hussien, R., and Brooks, G.A. (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. *Free Rad Biol Med* 49, 1646-1654.

Favero, T.G., Zable, A.C., and Abramson, J.J. (1995). Hydrogen peroxide stimulates the Ca<sup>2+</sup> release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270, 25557-25563.

Fluck, M. (2006). Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol* 209, 2239-2248.

Franceschi, R.T., Iyer, B.S., and Cui, Y. (1994). Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 9, 843-854.

Fredette, B.J., and Landmesser, L.T. (1991a). A reevaluation of the role of innervation in primary and secondary myogenesis in developing chick muscle. *Dev Biol* 143, 19-35.

Fredette, B.J., and Landmesser, L.T. (1991b). Relationship of primary and secondary myogenesis to fiber type development in embryonic chick muscle. *Dev Biol* 143, 1-18.

Frei, B., England, L., and Ames, B.N. (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6377-6381.

Freyria, A.M., Ronziere, M.C., Roche, S., Rousseau, C.F., and Herbage, D. (1999). Regulation of growth, protein synthesis, and maturation of fetal bovine epiphyseal chondrocytes grown in high-density culture in the presence of ascorbic acid, retinoic acid, and dihydrocytochalasin B. *J Cell Biochem* 76, 84-98.

Furuta, A., Rothstein, J.D., and Martin, L.J. (1997). Glutamate Transporter Protein Subtypes Are Expressed Differentially during Rat CNS Development. *J Neurosci* 17, 8363-8375.

Garcia M de, L., Salazar, K., Millan, C., Rodriguez, F., Montecinos, H., Caprile, T., Silva, C., Cortes, C., Reinicke, K., Vera, J.C., y cols. (2005). Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia* 50, 32-47.

Gaster, M., Handberg, A., Schurmann, A., Joost, H.G., Beck-Nielsen, H., and Schroder, H.D. (2004). GLUT11, but not GLUT8 or GLUT12, is expressed in human skeletal muscle in a fibre type-specific pattern. *Pflugers Arch* 448, 105-113.

Genneser, F. (2000). *Histología*, 3ra edn (Madrid. España., Editorial Médica Panamericana).

Gispert, S., Dutra, A., Lieberman, A., Friedlich, D., and Nussbaum, R.L. (2000). Cloning and genomic organization of the mouse gene *slc23a1* encoding a vitamin C transporter. *DNA Res* 7, 339-345.

Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zuniga, F.A., Sotomayor, P., Barra, V., Vasquez, O., Montecinos, V., Mardones, L., Guzman, C., y cols. (2007). Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. *J Biol Chem* 282, 615-624.

Gommans, I.M., Vlak, M.H., De Haan, A., and Van Engelen, B.G. (2002). Calcium regulation and muscle disease. *J Muscle Res Cell Motil* 23, 59- 63.

Gottschall, J., Zenker, W., Neuhuber, W., Mysicka, A., and Müntener, M. (1980). The sternomastoid muscle of the rat and its innervation. Muscle fiber composition, perikarya and axons of efferent. *Anat Embryol* 160, 285-300.

Guillet-Deniau, I., Leturque, A., and Girard, J. (1994). Expression and cellular localization of glucose transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT4) during differentiation of myogenic cells isolated from rat foetuses. *J Cell Sci* 107, 487-496.

Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 52, 253-265.

Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn* 195, 231-272.

Hashiramoto, M., and James, D. (2000). Characterization of Insulin-Responsive GLUT4 Storage Vesicles Isolated from 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Cell Biol* 20, 416-427.

- Hidalgo, C. (2005). Cross talk between Ca<sup>2+</sup> and redox signalling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/Ca<sup>2+</sup> release channels. . *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 2237-2244.
- Hidalgo, C., Aracena, P., Sanchez, G., and Donoso, P. (2002). Redox regulation of calcium release in skeletal and cardiac muscle. *Biol Res* 35, 183-193.
- Hidalgo, C., Bull, R., Behrens, M., and Donoso, P. (2004). Redox regulation of RyR-mediated Ca<sup>2+</sup> release in muscle and neurons *Biol Res* 37, 539-552.
- Hikida, R. (1972). The structure of the sarcotubular system in avian muscle. *Am J Anat* 134, 481-495.
- Hikida, R. (1987). Quantitative Ultrastructure of Histochemically Identified Avian Skeletal Muscle Fiber Types. *The Anatomical Record* 218, 128-135.
- Hirabayashi, M., Ijiri, D., Kamei, Y., Tajima, A., and Kanai, Y. (2005). Transformation of Skeletal Muscle from Fast- to Slow-Twitch during Acquisition of Cold Tolerance in the Chick. *Endocrinology* 146, 399-405.
- Hník, P., Jirmanová, I., Vyklický, L., and Zelená, J. (1967). Fast and slow muscles of the chick after nerve cross union. *J Physiol*, 193 309-325.
- Hoffman, E., Knudson, M., Campbell, K., and Kunkel, L.M. (1987). Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature* 330, 754-758.
- Hoppeler, H., and Flück, M. (2002). Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 205, 2143-2152.
- Hughes, R.E., Hurley, R.J., and Jones, E. (1980). Dietary ascorbic acid and muscle carnitine (p-OH-y-(trimethylamino) butyric acid) in guinea-pigs. *Br J Nutr* 43, 385-387.
- Hundal, H.S., Maxwell, D.L., Ahmed, A., Darakhshan, F., Mitsumoto, Y., and Klip, A. (1994). Subcellular distribution and immunocytochemical localization of Na,K-ATPase subunit isoforms in human skeletal muscle. *Mol Membr Biol* 11, 255-262.
- Huxley, A.F., and Hanson, J. (1954). Changes in the cross striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973 - 976
- Ijkema-Paassen, J., and Gramsbergen, A. (2005). Development of postural muscles and their innervation. *Neural Plast* 12, 141-151.
- Ishimoto, S., Goto, I., and Kuroiwa, Y. (1988). Early morphological changes in the striated muscles in normal and dystrophic chickens. *J Comp Pathol* 98, 69-79.

Jackson, M.J., and Palomero, J. (2007). The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102, 1664-1670.

Jaimovich, E., Reyes, R., Liberona, J.L., and Powell, J.A. (2000). IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca<sup>2+</sup> signals in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C998-C1010.

Jaimovich, E., and Rojas, E. (1994). Intracellular Ca<sup>2+</sup> transients induced by high external K<sup>+</sup> and tetracaine in cultured rat myotubes. *Cell Calcium* 15, 356-368.

Jansen, K.M., and Pavlath, G.K. (2008). Molecular control of mammalian myoblast fusion. *Methods Mol Biol* 475, 115-133.

Jiang, H., Li, H., and DiMario, J.X. (2006). Control of slow myosin heavy chain 2 gene expression by glycogen synthase kinase activity in skeletal muscle fibers. *Cell Tissue Res* 323, 489-494.

Jin, S.N., Mun, G.H., Lee, J.H., Oh, C.S., Kim, J., Chung, Y.H., Kang, J.S., Kim, J.G., Hwang, D.H., Hwang, Y.I., *et al.* (2005). Immunohistochemical study on the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in the respiratory system of adult rat. *Microsc Res Tech* 68, 360-367.

Johnson, M.A., Polgar, J., Weightman, D., and Appleton, D. (1973). Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J Neurol Sci* 18, 111-129.

Jordan, T., Jiang, H.L., and DiMario, J.X. (2005). Regulation of skeletal muscle fiber type and slow myosin heavy chain 2 gene expression by inositol triphosphate receptor 1. *J Cell Sci* 118, 2295-2302.

Jordan, T., Li, J., Jiang, H., and DiMario, J.X. (2003). Repression of slow myosin heavy chain 2 gene expression in fast skeletal muscle fibers by muscarinic acetylcholine receptor and Gαq signaling. *J Cell Biol* 162, 843-850.

Jorgensen, A., Klanins, V., Zubrzycka, E., and MacLennan, D. (1977). Assembly of the sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 74, 287-298.

Jorquera, G., Juretic, N., Jaimovich, E., and Riveros, N. (2009). Membrane depolarization induces calcium-dependent upregulation of Hsp70 and Hmox-1 in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C581-590.

Juretic, N., Urzua, U., Munroe, D.J., Jaimovich, E., and Riveros, N. (2007). Differential gene expression in skeletal muscle cells after membrane depolarization. *J Cell Physiol* 210, 819-830.

Kaainen, M., Papponen, H., and Metsikkö, K. (2008). Microdomains of endoplasmic reticulum within the sarcoplasmic reticulum of skeletal myofibers. *Exp Cell Res* 314, 237-245.

Kaisto, T., and Metsikkö, K. (2003). Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Exp Cell Res* 289, 47-57.

Kang, J.S., Kim, H.N., Jung da, J., Kim, J.E., Mun, G.H., Kim, Y.S., Cho, D., Shin, D.H., Hwang, Y.I., and Lee, W.J. (2007). Regulation of UVB-induced IL-8 and MCP-1 production in skin keratinocytes by increasing vitamin C uptake via the redistribution of SVCT-1 from the cytosol to the membrane. *J Invest Dermatol* 127, 698-706.

Kaprielian, Z., and Fambrough, D.M. (1987). Expression of fast and slow isoforms of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase in developing chick skeletal muscle. *Dev Biol* 124, 490-503.

Kardami, E., Montarras, D., and Fiszman, M. (1983). Fast and slow chicken skeletal muscles contain different alpha and beta tropomyosins. *Biochem Biophys Res Commun* 110(1): 147-154.

Kelly, A.M., and Zacks, S.I. (1969). The histogenesis of rat intercostal muscle. *J Cell Biol* 42, 135-153.

Khaskiye, A., Renaud, D., and Le Douarin, G. (1987). Effects of electrical stimulation upon post-hatching development of fibre types in normally innervated fast and slow latissimus dorsi muscles of the chicken. *Biol Cell* 61, 163-170.

Koppe, R.I., Hallauer, P.L., Karpati, G., and Hastings, K.E. (1989). cDNA clone and expression analysis of rodent fast and slow skeletal muscle troponin I mRNAs. *J Biol Chem* 264, 14327-14333.

Kuo, S.M., MacLean, M.E., McCormick, K., and Wilson, J.X. (2004). Gender and sodium-ascorbate transporter isoforms determine ascorbate concentrations in mice. *J Nutr* 134, 2216-2221.

Landmesser, L. (1978). The development of motor projection patterns in the chick hind limb. *J Physiol* 284, 391-414.

Lange, S., Himmel, M., Auerbach, D., Agarkova, I., Hayess, K., Fürst, D.O., Perriard, J.C., and Ehler, E. (2005). Dimerisation of myomesin: implications for the structure of the sarcomeric M-band. *J Mol Biol* 345, 289-298.

Le Nihouannen, D., Barralet, J.E., Fong, J.E., and Komarova, S.V. (2010). Ascorbic acid accelerates osteoclast formation and death. *Bone* 46, 1336-1343.



Lee, J.Y., Chang, M.Y., Park, C.H., Kim, H.Y., Kim, J.H., Son, H., Lee, Y.S., and Lee, S.H. (2003). Ascorbate-induced differentiation of embryonic cortical precursors into neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 73, 156-165.

Leeuwenburgh, C., Hollander, J., Leichtweis, S., Griffiths, M., Gore, M., and Ji, L.L. (1997). Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 272, R363–R369.

Lexell, J., Jarvis, J.C., Currie, J., Downham, D.Y., and Salmons, S. (1994). Fibre type composition of rabbit tibialis anterior and extensor digitorum longus muscles. *J Anat* 185, 95–101.

Li, Y., and Schellhorn, H.E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr* 137, 2171-2184.

Li, Z., Mericskay, M., Agbulut, O., Butler-Browne, G., Carlsson, L., Thornell, L.-E., Babinet, C., and Paulin, D. (1997). Desmin Is Essential for the Tensile Strength and Integrity of Myofibrils but Not for Myogenic Commitment, Differentiation, and Fusion of Skeletal Muscle. *J Cell Biol* 139, 129–144.

Liang, W.J., Johnson, D., and Jarvis, S.M. (2001). Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol Membr Biol* 18, 87-95.

Liang, W.J., Johnson, D., Ma, L.S., Jarvis, S.M., and Wei-Jun, L. (2002). Regulation of the human vitamin C transporters expressed in COS-1 cells by protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1696-C1704.

Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., y cols. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797-801.

Liu, Y., T., S., Randall, W.R., and Schneider, M.F. (2005). Signaling pathways in activity-dependent fiber type plasticity in adult skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 26, 13-21.

Low, M. (2010). Perfil de expresión y regulación del transportador de vitamina C SVCT2 durante el desarrollo del músculo esquelético. In *Biología Celular* (Concepción, Universidad de Concepción), pp. 210.

Low, M., Sandoval, D., Aviles, E., Perez, F., Nualart, F., and Henriquez, J.P. (2009). The ascorbic acid transporter SVCT2 is expressed in slow-twitch skeletal muscle fibres. *Histochem Cell Biol* 131, 565-574.

Low, M., Sandoval, D., Morales, B., Nualart, F., and Henriquez, J.P. (2011). Upregulation of the vitamin C transporter SVCT2 upon differentiation and depolarization of myotubes. *FEBS Lett* 585, 390-396.



Ludolph, D.C., and Konieczny, S.F. (1995). Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *FASEB J* 9, 1595-1604.

Lutsenko, E.A., Carcamo, J.M., and Golde, D.W. (2004). A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport. *Mol Cell Biol* 24, 3150-3156.

Malinska, D., Kudin, A., Bejtka, M., and Kunz, W.S. (2011). Changes in mitochondrial reactive oxygen species synthesis during differentiation of skeletal muscle cells. *Mitochondrion*.

Marette, A., Burdett, E., Douen, A., Vranic, M., and Klip, A. (1992). Insulin induces the translocation of GLUT4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle. *Diabetes* 41, 1562-1569.

Martonosi, A., and Pikula, S. (2003). The structure of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochimica Polonica* 50, 337- 365.

Martonosi, A.N. (1995). The structure and interactions of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biosci Rep* 5, 263–282.

Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493-495.

May, J.M., and Qu, Z.C. (2005). Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. *Arch Biochem Biophys* 434, 178-186.

McComas, A.J. (1996). *Skeletal Muscle, Form and Function* (New Zealand, Human Kinetics).

McCullagh, K., Calabria, E., Pallafacchina, G., Ciciliot, S., Serrano, A., Argentini, C., Kalhovde, J., Lømo, T., and Schiaffino, S. (2004). NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *PNAS* 101, 10590-10595.

McGinley, C., Shafat, A., and Donnelly, A. (2009). Does antioxidant vitamin supplementation protect against muscle damage? *Sport Medicine* 39, 1011-1032.

Meintanis, C., Karagouni, A.D., and Diallinas, G. (2000). Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family. *Mol Membr Biol* 17, 47-57.

Miller, J.B., Crow, M.T., and Stockdale, F.E. (1985). Slow and fast myosin heavy chain content defines three types of myotubes in early muscle cell cultures. *J Cell Biol* 101, 1643-1650.

Miller, J.B., and Stockdale, F.E. (1986). Developmental origins of skeletal muscle fibers: clonal analysis of myogenic cell lineages based on expression of fast and slow myosin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3860-3864.

Mitsumoto, Y., Burdett, E., Grant, A., and Klip, A. (1991). Differential expression of the GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during differentiation of L6 muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175, 652-659.

Mitsumoto, Y., Liu, Z., and Klip, A. (1994). A long-lasting vitamin C derivative, ascorbic acid 2-phosphate, increases myogenin gene expression and promotes differentiation in L6 muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 394-402.

Moopanar, T., and Allen, D. (2005). Reactive oxygen species reduce myofibrillar  $Ca^{2+}$  sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37°C. *J Physiol* 564, 189-199.

Morgan, D.L., and Proske, U. (1984). Vertebrate Slow Muscle: Its Structure, Pattern of Innervation, and Mechanical Properties. *Physiol Rev* 64, 103-169.

Moser, U. (1987). Uptake of ascorbic acid by leukocytes. *Ann N Y Acad Sci* 498, 200-215.

Mun, G.H., Kim, M.J., Lee, J.H., Kim, H.J., Chung, Y.H., Chung, Y.B., Kang, J.S., Hwang, Y.I., Oh, S.H., Kim, J.G., *et al.* (2006). Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain. *J Neurosci Res* 83, 919-928.

Muñoz, P., Roseblatt, M., Testar, X., Palacín, M., Thoidis, G., Pilch, P., and Zorzano, A. (1995a). The T-tubule is a cell-surface target for insulin-regulated recycling of membrane proteins in skeletal muscle. *Biochem J* 312, 393-400.

Muñoz, P., Roseblatt, M., Testar, X., Palacín, M., and Zorzano, A. (1995b). Isolation and characterization of distinct domains of sarcolemma and T-tubules from rat skeletal muscle. *Biochem J* 307, 273-280.

Musaro, A., Fulle, S., and Fano, G. (2010). Oxidative stress and muscle homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13, 236-242.

NAS (2010). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Eighth Edition (National Academy of Sciences).

Nishikimi, M., and Yagi, K. (1991). Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 54, 1203S-1208S.

Nori, A., Bortoloso, E., Frasson, F., Valle, G., and Volpe, P. (2004). Vesicle budding from endoplasmic reticulum is involved in calsequestrin routing to sarcoplasmic reticulum of skeletal muscles. *Biochem J* 379, 505-512.

Nori, A., Valle, G., Massimino, M., and Volpe, P. (2001). Targeting of calsequestrin to the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle upon deletion of its glycosylation site. *Exp Cell Res* 265, 104-113.

Nualart, F.J., Rivas, C.I., Montecinos, V.P., Godoy, A.S., Guaiquil, V.H., Golde, D.W., and Vera, J.C. (2003). Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem* 278, 10128-10133.

O'Neill, M.C., and Stockdale, F.E. (1972). A kinetic analysis of myogenesis in vitro. *J Cell Biol* 52, 52-65.

Obinata, T., Reinach, F.C., Bader, D.M., Masaki, T., Kitani, S., and Fischman, D.A. (1984). Immunochemical analysis of C-protein isoform transitions during the development of chicken skeletal muscle. *Dev Biol* 101, 116-124.

Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci* 15, 353-363.

Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., *et al.* (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22, 18-35.

Page, S. (1969). Structure and some contractile properties of fast and slow muscles of the chicken. *J Physiol* 205, 131-145.

Peake, J.M. (2003). Vitamin C: effects of exercise and requirements with training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 13, 125-151.

Percival, A., Williams, A., Kenyon, J., Grinsell, M., Airey, J., and Sutko, J. (1994). Chicken Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Isoforms: Ion Channel Properties. *Biophys J* 67, 1834-1850.

Perry, R.L., and Rudnick, M.A. (2000). Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* 5, D750-D767.

Perry, S.V. (1998). Troponin T: genetics, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 19, 575-602.

Pette, D., and Staron, R.S. (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 116, 1-76.

Pette, D., and Staron, R.S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50, 500-509.

Pette, D., and Staron, R.S. (2001). Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 115 359-372.

Pette, D., and Vrbová, G. (1985). Neural control of phenotypic expresión in mammalian muscle fibres. *Muscle and Nerve* 8, 676-689.

Plomgaard, P., Penkowa, M., Leick, L., Pedersen, B.K., Saltin, B., and Pilegaard, H. (2006). The mRNA expression profile of metabolic genes relative to MHC isoform pattern in human skeletal muscles. *J Appl Physiol* 101, 817-825.

Ploug, T., van Deurs, B., Ai, H., Cushman, S., and Evelyn Ralston, E. (1998). Analysis of GLUT4 Distribution in Whole Skeletal Muscle Fibers: Identification of Distinct Storage Compartments That Are Recruited by Insulin and Muscle Contractions. *J Cell Biol* 142, 1429-1446.

Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., and Dudley, G. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 266, R375–R380.

Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88, 1243-1276.

Pownall, M.E., Gustafsson, M.K., and Emerson, C.P., Jr. (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 747-783.

Rafuse, V.F., Milner, L.D., and Landmesser, L.T. (1996). Selective innervation of fast and slow muscle regions during early chick neuromuscular development. *J Neurosci* 16, 6864-6877.

Rajan, D.P., Huang, W., Dutta, B., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., and Prasad, P.D. (1999). Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 762-768.

Rall, J.A., and Schottelius, B.A. (1973). Energetics of Contraction in Phasic and Tonic Skeletal Muscles of the Chicken. *J Gen Physiol* 62, 303-323.

Reid, M.B., and Durham, W.J. (2002). Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. *Ann N Y Acad Sci* 959, 108-116.

Reid, S., Kennedy, J., Shimizu, N., Stewart, A., Vrbová, G., and Zak, R. (1989). Regulation of expression of avian slow myosin heavy-chain isoforms. *Biochem J* 260, 449-454.

Reinach, F.C., Masaki, T., and Fischam, D.A. (1983). Characterization of the C-Protein from Posterior Latissimus Dorsi Muscle of the Adult Chicken: Heterogeneity within a Single Sarcomere. *J Cell Biol* 96, 297-300.

Reinach, F.C., Masaki, T., Sahafiq, S., Obinata, T., and Fischam, D.A. (1982). Isoforms of C-protein in Adult Chicken Skeletal Muscle: Detection with Monoclonal Antibodies. *J Cell Biol* 95, 78-84.

Rodnick, K., Slotnik, J., Studelska, D., Hanpeter, D., Robinson, L., Geuzell, H., and James, D. (1992). Immunocytochemical and Biochemical Studies of GLUT4 in Rat Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 267, 6278-6285.

Rose, R.C. (1986). Ascorbic acid transport in mammalian kidney. *Am J Physiol* 250, F627-F632.

Rossi, D., Barone, V., Giacomello, E., Cusimano, V., and Sorrentino, V. (2008). The Sarcoplasmic Reticulum: An Organized Patchwork of Specialized Domains. *Traffic* 9, 1044-1049.

Rumsey, S.C., Daruwala, R., Al-Hasani, H., Zarnowski, M.J., Simpson, I.A., and Levine, M. (2000). Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 275, 28246-28253.

Rumsey, S.C., Kwon, O., Xu, G.W., Burant, C.F., Simpson, I., and Levine, M. (1997). Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 272, 18982-18989.

Salazar, K. (2010). Efecto de la vitamina C en la diferenciación postnatal de neuronas corticales (Concepción, Universidad de Concepción), pp. 211.

Savini, I., Catani, M.V., Duranti, G., Ceci, R., Sabatini, S., and Avigliano, L. (2005). Vitamin C homeostasis in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 38, 898-907.

Savini, I., Catani, M.V., Rossi, A., Duranti, G., Melino, G., and Avigliano, L. (2002). Characterization of keratinocyte differentiation induced by ascorbic acid: protein kinase C involvement and vitamin C homeostasis. *J Invest Dermatol* 118, 372-379.

Savini, I., Rossi, A., Catani, M., Ceci, R., and Avigliano, L. (2007). Redox regulation of vitamin C transporter SVCT2 in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 385-390.

Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., and Catani, M.V. (2008). SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* 34, 347-355.

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76, 371-423.

Schorah, C.J. (1992). The transport of vitamin C and effects of disease. *Proc Nutr Soc* 51, 189-198.

Shah, S., Davis, J., Weisleder, N., Kostavassili, I., McCulloch, A., Ralston, E., Capetanaki, Y., and Lieber, R. (2004). Structural and Functional Roles of Desmin in Mouse Skeletal Muscle during Passive Deformation. *Biophysical Journal* 86, 2993-3008.

Shear, C. (1978). Cross sectional myofibre and myofibril growth in immobilized developing skeletal muscle. *J Cell Sci* 29, 297-312.

Shear, C., and Goldspink, G. (1971). Structural and physiological changes associated with the growth of avian fast and slow muscle. *J Morphol* 135, 351-372.

Shima, A., Pham, J., Blanco, E., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and R., M. (2011). IGF-I and vitamin C promote myogenic differentiation of mouse and human skeletal muscle cells at low temperatures. *Exp Cell Res* 317, 356-366.

Sirca, A., and Kostevc, V. (1985). The fibre type composition of thoracic and lumbar paravertebral muscles in man. *J Anat* 141, 131-137.

Sjöström, M., Lexell, J., and Downham, D.Y. (1992). Differences in fiber number and fiber type proportion within fascicles. A quantitative morphological study of whole vastus lateralis muscle from childhood to old age. *Anat Rec* 234, 183-189.

Skeie, G.O. (2000). Skeletal muscle titin: physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 57, 1570-1576.

Spangenburg, E.E., and Booth, F.W. (2003). Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand* 178, 413-424.

Spencer, T., and Posterino, G.S. (2009). Sequential effects of GSNO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the contractile apparatus of fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers from the rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1015-C1023.

Starr, R., and Offer, G. (1978). The Interaction of C-Protein with Heavy Meromyosin and Subfragment-2. *Biochem J* 171, 813-816.

Stockdale, F.E. (1992). Myogenic cell lineages. *Dev Biol* 154, 284-298.

Stockdale, F.E., and Miller, J.B. (1987). The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles. *Dev Biol* 123, 1-9.

Stuart, C.A., Wen, G., Gustafson, W.C., and Thompson, E.A. (2000). Comparison of GLUT1, GLUT3, and GLUT4 mRNA and the subcellular distribution of their proteins in normal human muscle. *Metabolism* 49, 1604-1609.



Stuart, C.A., Yin, D., Howell, M.E., Dykes, R.J., Laffan, J.J., and Ferrando, A.A. (2006). Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E1067-E1073.

Subramanian, V.S., Marchant, J.S., Reidling, J.C., and Said, H.M. (2008). N-Glycosylation is required for Na<sup>+</sup>-dependent vitamin C transporter functionality. *Biochem Biophys Res Commun* 374 123-127.

Sun, J., Xu, L., Eu, J.P., Stamler, J.S., and Meissner, G. (2001). Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* 276, 15625-15630.

Sung, Y.K., Kwack, M.H., Kim, S.R., Kim, M.K., and Kim, J.C. (2008). Transcriptional activation of CCN1 and CCN2, targets of canonical Wnt signal, by ascorbic acid 2-phosphate in human dermal papilla cells. *J Dermatol Sci* 49, 256-259.

Suzuki, Y.J., Cleemann, L., Abernethy, D.R., and Morad, M. (1998). Glutathione is a cofactor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated stimulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 24, 318-325.

te Pas, M., Everts, M., and Haagsman, H. (2004). Muscle development of livestock animals. *Physiology, Genetics and Meat Quality* (Wallingford, CAB International).

Thomas, K., Navarro, J., Benson, R., Campbell, K., Rotundo, R., and Fine, R. (1989). Newly Synthesized Calsequestrin, Destined for the Sarcoplasmic Reticulum, Is Contained in Early/Intermediate Golgi-derived Clathrin-coated Vesicles. *J Biol Chem* 264(6): 3140-3145.

Thompson, D., Williams, C., Kingsley, M., Nicholas, C.W., Lakomy, H.K., McArdle, F., and Jackson, M.J. (2001). Muscle soreness and damage parameters after prolonged intermittent shuttle-running following acute vitamin C supplementation. *Int J Sports Med* 22, 68-75.

Tillack, T., Boland, R., and Martonosi, A. (1974). The ultrastructure of developing sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249, 624-633.

Toutain, P.L., Bechu, D., and Hidioglou, M. (1997). Ascorbic acid disposition kinetics in the plasma and tissues of calves. *Am J Physiol* 273, R1585-R1597.

Toutant, J.P. (1982). Quantitative and histochemical aspects of the differentiation of muscle spindles in the anterior latissimus dorsi of the developing chick. *Anat Embryol* 163, 475-485.



Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U.V., Chen, X.Z., Wang, Y., Brubaker, R.F., and Hediger, M.A. (1999). A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters *Nature* 399, 70-75.

Urso, M.L., and Clarkson, P.M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189, 41-54.

Valdés, J.A., Gaggero, E., Hidalgo, J., Leal, N., Jaimovich, E., and Carrasco, M.A. (2008). NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294, C715-C725.

Vettor, R., Milan, G., Franzin, C., Sanna, M., De Coppi, P., Rizzuto, R., and Federspil, G. (2009). The Origin of Intermuscular Adipose Tissue and Its Pathophysiological Implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E987-E998.

Volpe, P., Villa, A., Podini, P., Martini, A., Nori, A., Panzeri, M., and Meldolesi, J. (1992). The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection: Distribution of endoplasmic reticulum markers in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibers. *PNAS* 89, 6142-6146.

Wang, H., Dutta, B., Huang, W., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., and Prasad, P.D. (1999). Human Na(+)-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a nonfunctional splice variant. *Biochim Biophys Acta* 1461, 1-9.

Wang, S.M., and Greaser, M.L. (1985). Immunocytochemical studies using a monoclonal antibody to bovine cardiac titin on intact and extracted myofibrils. *J Muscle Res Cell Motil* 6, 293-312.

Wang, Y., Mackenzie, B., Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C.C., and Hediger, M.A. (2000). Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 488-494.

Wigmore, P.M., and Dunglison, G.F. (1998). The generation of fiber diversity during myogenesis. *Int J Dev Biol* 42, 117-125.

Wilson, J.X. (1990). Regulation of ascorbic acid concentration in embryonic chick brain. *Dev Biol* 139, 292-298.

Wilson, J.X. (2005). Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr* 25, 105-125.

Williams, M., Resneck, W., Kaysser, T., Ursitti, J., Birkenmeier, C., Barker, J., and Bloch, R. (2001). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in skeletal muscle: two populations of B-spectrin control localization in the sarcolemma but not partitioning between the sarcolemma and the transverse tubules. *J Cell Sci* 114, 751-762.

Windisch, A., Gundersen, K., Szabolcs, M.J., Gruber, H., and Lømo, T. (1998). Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol* 510, 623-632.

Wu, J.S., Hogan, G.R., and Morris, J.D. (1985). Modified methods for preparation of cryostat sections of skeletal muscle. *Muscle Nerve* 8, 664-666.

Wu, X., Itoh, N., Taniguchi, T., Nakanishi, T., and Tanaka, K. (2003a). Requirement of calcium and phosphate ions in expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 and osteopontin in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1641, 65-70.

Wu, X., Itoh, N., Taniguchi, T., Nakanishi, T., Tatsu, Y., Yumoto, N., and Tanaka, K. (2003b). Zinc-induced sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression: potent roles in osteoblast differentiation. *Arch Biochem Biophys* 420, 114-120.

Yan, J., Studer, L., and McKay, R.D. (2001). Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem* 76, 307-311.

Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, S., Nielsen, A.R., Mounier, R., Mortensen, O.H., Lykkesfeldt, J., Rose, A.J., Fischer, C.P., and Pedersen, B.K. (2010). Antioxidant supplementation does not alter endurance training adaptation. *Med Sci Sports Exerc* 42, 1388-1395.

Zable, A.C., Favero, T.G., and Abramson, J.J. (1997). Glutathione modulates ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for redox regulation of the Ca<sup>2+</sup> release mechanism. *J Biol Chem* 272, 7069-7077.

Zhang, M., Koishi, K., and McLennan, I.S. (1998). Skeletal muscle fibre types: detection methods and embryonic determinants. *Histol Histopathol* 13, 201-207.

Zhou, L.Z., Johnson, A.P., and Rando, T.A. (2001). NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 31, 1405-1416.