Universidad de Alcalá
COMISIÓN DOCENTE

FACULTAD DE FARMACIA
Campus uniersitario
Carretera Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Telf. (+34) 918 854 680
FAX (+34) 918 854 680
E-mail: decanato.farmacia@uah.es
http:/www.uah.es/farmacia

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

Universidad de Alcalá

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

Título: **Efecto de la hiperfosfatemia sobre las células del músculo esquelético**

Autor: Zeena Yaqoob Noah Almarbena

Tutor: María Piedad Ruiz Torres

Curso: Quinto Curso de Grado en Farmacia

Universidad de Alcalá
COMISIÓN DOCENTE

FACULTAD DE FARMACIA
Campus universitario
Carretera Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Telf. (+34) 918 854 680
FAX (+34) 918 854 680
E-mail: decanato.farmacia@uah.es
http:/www.uah.es/farmacia

ANEXO 9

AUTORIZACIÓN E INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

D/Dª María Piedad Ruiz Torres
Profesor del Departamento de Biología de Sistemas
como tutor del Trabajo de Fin de Grado en Farmacia de
D/Dª Zeena Yaqoob Noah Almarbena

Titulado: **Efecto de la hiperfosfatemia sobre las células de músculo esquelético.**

INFORMA: Que ha sido realizado y redactado por el/la mencionado/a alumno/a bajo mi dirección y con esta fecha autorizo a su presentación y defensa pública

Alcalá de Henares 6 de Julio de 2016

Fdo.: Mª Piedad Ruiz Torres

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

ÍNDICE

I. RESUMEN iii

I. ABSTRACT iii

II. ABREVIATURAS iv

III. INTRODUCCIÓN 1

1. Senescencia celular 1

1.1. Vías de regulación de senescencia 2

1.1.1. Vía de regulación de p53 2

1.1.2. Vía de regulación de p16 2

1.2. Senescencia celular y envejecimiento 3

2. Mecanismos de inducción de senescencia: El mantenimiento de la homeostasis proteica 3

2.1. Autofagia: Definición y regulación 3

2.1.1. Autofagia y p62 4

2.1.2. Autofagia y envejecimiento 4

2.2. Sistema de calpaínas 4

2.3. El proteosoma 5

3. Hiperfosfatemia como inductora del envejecimiento celular 5

IV. HIPÓTESIS 7

V. OBJETIVOS 7

1. Objetivo general 7

2. Objetivos específicos 7

VI. MATERIALES Y MÉTODOS 8

1. Diseño experimental 8

2. Materiales empleados 8

2.1. Cultivo de células de músculo esquelético de ratón C2C12 8

2.2. Reactivos 9

2.3. Tratamiento de células 9

3. Métodos 9

3.1. Análisis del contenido proteico celular mediante western blot 9

3.2. Medida de la actividad β-galactosidasa por microscopía confocal 11

3.3. Cierre de herida 12

4. Análisis estadístico 12

VII. RESULTADOS 13

1. El β-glicerofosfato induce senescencia en mioblastos de músculo esquelético a través de las vías p53 y p16^{INK4a} 13

2. El β-glicerofosfato induce disminución de la actividad autofágica 14

3. El β-glicerofosfato induce incremento en el sistema de calpaínas 16

4. El β-glicerofosfato reduce la capacidad proliferativa de mioblastos 17

VIII. DISCUSIÓN 19

1. La hiperfosfatemia induce el envejecimiento 20

2. La hiperfosfatemia induce senescencia por aumento en la expresión de p53-p21 y la actividad β-galactosidasa 20

3. La hiperfosfatemia induce senescencia por alteración de los mecanismos de la homeostasis proteica 21

4. La hiperfosfatemia afecta a la proliferación celular 21

IX. CONCLUSIÓN 23

X. BIBLIOGRAFÍA 24

I. RESUMEN

Los cambios que tienen lugar durante el proceso de envejecimiento conducen a una disminución funcional de los órganos, entre los que se encuentra el músculo esquelético. El envejecimiento a nivel celular es conocido como senescencia celular. La senescencia celular es una parada irreversible del ciclo celular y puede estar inducida por distintos estímulos ambientales entre los cuales puede estar implicada la hiperfosfatemia.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las altas concentraciones de fosfato extracelular inducen senescencia en células de músculo esquelético a través de la vía p53-p21. Además, se demuestra que la hiperfosfatemia induce senescencia mediante la disminución de la actividad autofágica y el aumento en la expresión de calpaínas, lo que favorecería la acumulación de tejidos dañados y la degradación de proteínas del sarcómero. Estos resultados sugieren que la hiperfosfatemia podría ser un factor importante en el desarrollo de la sarcopenia.

I. ABSTRACT

During the aging process, changes lead to a functional impairment of the organs, such as skeletal muscle. At the cellular level, the aging process is known as cellular senescence. Cellular senescence is a permanent and irreversible cell growth arrest and may be induced by various environmental stimuli including hyperphosphatemia.

The results obtained in this study show that high concentrations of extracellular phosphate induce senescence in skeletal muscle cells through p53-p21 pathways. Furthermore, it is shown that hyperphosphatemia induces senescence by reducing autophagic activity and increased expression of calpains, favoring the accumulation of damaged tissues and protein degradation sarcomere. These results suggest that hyperphosphatemia could be an important development factor sarcopenia.

PALABRAS CLAVE: Envejecimiento, senescencia, hiperfosfatemia, sarcopenia, células satélites.

II. ABREVIATURAS

ARF	***A**lternative **r**eading **f**rame **p**rotein*
Atg	Genes relacionados con autofagia (***A**utophagy **r**elated **g**enes*)
BGP	β-glicerofosfato
BSA	Albúmina sérica bovina (***B**ovin **s**erum **a**lbumin*)
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (***C**yclin **d**ependent **k**inase*)
DAPI	Diaminofenilindol
FBS	Suero fetal bovino (***F**oetal **b**ovine **s**erum*)
FGF23	Factor de crecimiento de fibroblastos 23
GAPDH	***G**lycer**a**ldehyde 3-**p**hosphate **d**e**h**ydrogenase*
HDM2	***H**uman **d**oble **m**inute **2***
mTOR	***M**ammalian **t**arget **o**f **r**apamycin*
PBS	Solución salina de fosfato (***P**hosphate-**b**uffered **s**aline*)
PCNA	***P**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen*
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Phenylmethylsulfonyl fluoride)
PVDF	***P**oly**v**inylidene **di**fluoride*
SA-β-gal	Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia
SDS	Dodecil sulfato sódico (***s**odium **d**odecyl **s**ulafate*)
Tris	*Trishydroxymethylaminomethane*
TTBS	Tampón-tween tris salino

III. INTRODUCCIÓN

En número de personas mayores de 65 años está en progresivo aumento; estimándose que, en 2025 habrá más de 1200 millones de ancianos en el mundo [(1)]. El envejecimiento es un proceso multifactorial, en el que intervienen varios factores ambientales, genéticos y hormonales y caracterizado por afectar a todas las células y tejidos del organismo. El envejecimiento está relacionado con procesos inflamatorios, perdida de la densidad ósea y la presencia de enfermedades cardiovasculares, conllevando a una disminución de la actividad física y cognitiva, así como de la función metabólica.

Una de las patologías relacionadas con el envejecimiento es la sarcopenia, que consiste en la pérdida involuntaria de la masa y fuerza muscular asociada a la edad [(2)]. Los cambios que suceden en el músculo sarcopénico durante el proceso del envejecimiento consisten, entre otros, en una disminución de las fibras musculares tipo II (fibras blancas) responsables de la contracción rápida, y un aumento de las fibras musculares tipo I (fibras rojas) responsables de la contracción lenta. Los sarcómeros (unidad funcional del músculo) se encuentran reemplazados por tejido fibroso y adiposo causando acortamiento de la fibra muscular y reducción de la capacidad de contracción [(2)]. Además, se ha descrito el número y la función de células satélites, responsables de la renovación y regeneración del músculo esquelético, disminuyen con la edad contribuyendo a la nula o ineficiente reparación del músculo y favoreciendo la aparición de sarcopenia [(3)].

1. Senescencia celular

La proliferación y diferenciación celular son esenciales para la formación, reparación y mantenimiento de la adecuada funcionalidad de todos los tejidos y órganos en el organismo. Ciertas células pierden irreversiblemente esta capacidad de división originando la entrada en el proceso de senescencia. Fue definida por primero vez por Hayflik como un proceso que limita la proliferación celular [(4)]. Las células senescentes presentan morfología alterada, gran heterogeneidad, expresión

de actividad de β-galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal), acumulación de gránulos de lipofuscina y pérdida de respuesta a estímulos mitógenos [5].

La senescencia celular puede ser tanto de tipo replicativo (asociada al progresivo acortamiento de los telómeros) como de tipo prematuro (asociada a diferentes situaciones de estrés fisiológico, independientemente del número de divisiones celulares) e inducida tras la activación de los dos principales supresores tumorales p53 y $p16^{INK4a}$ [6].

1.1. Vías de regulación de senescencia

La senescencia puede estar inducida por distintos estímulos senescentes que establecen y mantienen la parada del ciclo celular. Estos estímulos activan las vías de p53 y $p16^{INK4a}$. Ambas vías están reguladas por la proteína del retinoblastoma (pRB), cuya función es la inhibición del ciclo celular entre la fase G_1 y S. Para realizar esta función, la pRB se une e inhibe los factores de transcripción de la familia E2F (inducen la entrada en la fase S). Cuando pRB se une a E2F, éste se inactiva permaneciendo la célula estancada en la fase G_1 e inhibiendo la proliferación celular [7].

1.1.1. Vía de regulación de p53

p53 es un mediador crucial de las respuestas celulares a daños en el ADN, incluyendo también la respuesta senescente. Esta vía se encuentra regulada por la proteína E3 ubiquitin ligasa HDM2 (MDM2 en ratones) que une p53 con ubiquitinas para ser degradada por la vía del proteosoma. HDM2 a su vez se encuentra regulada negativamente por la proteína ARF. En presencia de estímulo senescente se activa ARF que inhibe a HDM2, inhibiendo así la degradación de p53 por el proteosoma. p53 activo actúa como factor de transcripción de p21, un inhibidor de CDK, que suprime la fosforilación de la pRB, activándola y dando lugar a una parada del ciclo celular [8].

1.1.2. Vía de regulación de p16

$p16^{INK4a}$ es un gen que forma parte del locus INK4a/ARF, que codifica para dos proteínas: $p16^{INK4a}$, inhibidor de las CDK4 y CDK6, y la proteína ARF que es un potente regulador de la actividad de p53. $p16^{INK4a}$ actúa uniéndose a CDK4/6 induciendo así un cambio conformacional alostérico que interrumpe la interacción con la ciclina D y como consecuencia se antagoniza la activación de la CDK [9].

1.2. Senescencia celular y envejecimiento

La senescencia celular está implicada en el envejecimiento dado que las células senescentes son incapaces de autorrenovarse, contribuyendo a la aparición de fallo inmunológico, pobre cicatrización, atrofia de la piel, disminución de la función gastrointestinal, etc. Además, las células senescentes secretan factores que afectan al crecimiento celular, la migración y la angiogénesis. Estos factores asociados al fenotipo secretor asociado a senescencia, que incluye potentes citoquinas inflamatorias, hace que se promueva el envejecimiento de las células residentes en los tejidos donde aparecen y las patologías asociadas [10].

2. Mecanismos de inducción de senescencia: El mantenimiento de la homeostasis proteica

La homeostasis proteica requiere un fino balance entre la síntesis y la degradación de proteínas. Aunque se conocen varios procesos biológicos que están involucrados en la proteólisis, los sistemas más estudiados en relación al envejecimiento y las enfermedades relacionadas, son: El sistema lisosomal (autofagia), el sistema de calpaínas y el proteosoma [11].

2.1. Autofagia: Definición y regulación

La autofagia es un proceso cuya función es la degradación y el reciclaje de orgánulos y material citoplasmático, permitiendo a los organismos sobrevivir bajo condiciones de estrés celular mediante el reciclado [11].

En la regulación de la autofagia intervienen alrededor de 30 proteínas, la mayoría nombradas Atg. La regulación comienza con unas estructuras que son preautofagosomas o fagóforos y se sintetiza la doble membrana. Una de estas

proteínas esenciales en este fagóforo es Atg14L, que recluta a Atg16L o LC3I a la membrana. Un paso fundamental es la unión de fosfatidiletanolamina a LC3I, formándose LC3II que participa en la formación del autofagosoma. La membrana del autofagosoma se fusiona con el lisosoma, generando el fagolisosoma. En él, todo el contenido que ha quedado englobado junto con la membrana interna, será degradado por las hidrolasas lisosomales, donde saldrán aminoácidos y ácidos grasos que podrán ser utilizados por las células. El LC3II, localizado en las membranas del autofagosoma y esencial en su biogénesis, es degradado al final. Cuando la autofagia no es funcional, se acumula el LC3II, por lo cual, puede usarse como un marcador en la detección de la disminución de la actividad autofágica [12].

2.1.1. Autofagia y p62

La autofagia es un proceso muy controlado y bastante específico, como lo es en la degradación de proteínas ubiquitinadas a través de SQSTM1/p62. p62 se une directamente a la familia de proteínas LC3. Además, esta proteína se degrada por sí misma durante la autofagia y puede servir para enlazar proteínas ubiquitinadas a la maquinaria autofágica para permitir su degradación en el lisosoma. Cuando se inhibe la autofagia, la p62 se acumula y ocurre al contrario cuando se induce la autofagia [13]. Por lo cual, la p62 puede usarse como un marcador para estudiar el funcionamiento de la autofagia.

2.1.2. Autofagia y envejecimiento

Muchas células muestran una reducción de su función autofágica durante el envejecimiento, y sobre todo las células satélites del músculo esquelético. Como consecuencia del proceso del envejecimiento, la actividad autofágica está disminuida afectando al proceso de limpieza interna; haciendo que se acumule dentro de las células madre musculares proteínas dañadas y orgánulos, como las mitocondrias que no han podido ser eliminados correctamente. Esta disminución de la actividad autofágica en las células satélites viejas es el mecanismo que desencadena la senescencia en las células madre musculares [14].

2.2. Sistema de calpaínas

Otra vía de degradación de proteínas es el sistema de calpaínas. Las calpaínas constituyen una superfamilia de cisteín-proteasas no lisosomales de actividad que depende del calcio y poseen un inhibidor de su actividad: La calpastatina [15]. Las calpaínas se clasifican según su localización en los tejidos, siendo las calpaínas 1 y 2 muy ubicuas y la calpaína 3 específica del músculo esquelético [16]. El hecho de que las calpaínas aumenten o su inhibidor, la calpastatina, disminuya está relacionado con la degradación proteolítica favoreciendo la aparición de diversas patologías entre ellas, la distrofia muscular [15].

2.3. El proteosoma

El proteosoma es un complejo proteasa multisubunidad y juega un papel crucial en la degradación de proteínas de vida corta, que presentan algún deterioro como proteínas anormales, mal plegadas u oxidadas, las cuales tieneden a acumularse con la edad [17]. La estructura más común del proteosoma es la 26S, la cual está directamente relacionada con la degradación de proteínas vía sistema de ubiquitina.

Se observa que la función del proteosoma disminuye durante el envejecimiento y la senescencia celular, contribuyendo al deterioro de diversos tejidos, entre ellos, el muscular [18]. Por lo cual, el proteosoma puede ser un marcador útil para ver si hay senescencia en las células satélites musculares.

3. Hiperfosfatemia como inductora del envejecimiento celular

El fósforo es un mineral importante que se incorpora con la dieta y se encuentra en el organismo asociado con el oxígeno en forma de fosfato. El mantenimiento del fosfato sérico en rangos fisiológicos es crítico para muchos procesos biológicos. Los niveles normales de fosfato en suero oscilan en adultos entre 2,5 y 4,5 mg/dL, y en niños entre 4 y 7 mg/dL. El fosfato inorgánico es un componente esencial de huesos, ácidos nucleicos y membranas celulares. Juega un papel crucial en el metabolismo energético celular (producción de ATP) y señalización intracelular por fosforilación de proteínas [19].

La hiperfosfatemia es un trastorno hidroelectrolítico en el cual hay un nivel anormalmente elevado de fosfato en sangre. A menudo se suele acompañar de niveles bajos de calcio (hipocalcemia) debido a la precipitación del fosfato con el calcio en los tejidos. La hiperfosfatemia se asocia con la fisiopatología de distintas enfermedades tales como la sarcopenia, la calcificación vascular y la enfermedad renal crónica, entre otras, haciendo que haya una relación inversa entre la longevidad y los niveles de fosfato en suero de mamíferos [20].

Atendiendo a lo mencionado anteriormente, el presente trabajo pretende analizar el efecto de la hiperfosfatemia sobre las células del músculo esquelético. La exposición de células satélites (células quiescentes que dan lugar a mioblastos) a altas concentraciones de fosfato extracelular podría inducir senescencia celular, siendo este un mecanismo asociado a la sarcopenia. Se propone analizar los mecanismos implicados en la inducción de senescencia.

IV. HIPÓTESIS

En el presente trabajo se ha planteado la siguiente hipótesis: La hiperfosfatemia induce senescencia en mioblastos de músculo esquelético modificando la homeostasis proteica, y de esta forma podría contribuir a la aparición de sarcopenia.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo general de este estudio es analizar el papel de la hiperfosfatemia en el proceso de senescencia en células de músculo esquelético (mioblastos), analizando los mecanismos implicados en dichos procesos.

2. Objetivos específicos

Estudiar *in vitro* los mecanismos intracelulares implicados en el proceso de senescencia celular y autofagia inducida por altos niveles de fosfato a nivel de células de músculo esquelético. Para ello se analizaron:

- Vías de senescencia implicadas (p53-p21 y p16).
- Actividad β-galactosidasa por microscopía confocal.
- Efecto de la hiperfosfatemia sobre los sistemas de degradación de proteínas: calpaínas y autofagia (para la autofagia se analizarán los niveles de LC3II/LC3I y p62).
- Cambios en los sistemas proteolíticos y su relación con la senescencia mediante el análisis de β-galactosidasa en presencia de inhibidores.
- Efecto de la hiperfosfatemia sobre la capacidad proliferativo de los mioblastos analizando el PCNA y el cierre de la herida en placa.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

Para llevar a cabo este trabajo, se realizaron experimentos *in vitro.* Para ello, se utilizaron células de músculo esquelético de ratón en cultivo (C2C12) en pases seis a once. Las células fueron tratadas con un donador de fósforo, el β-glicerofosfato (BGP 10 mM) a 24 y 48 horas para inducir senescencia celular.

Se analizó la expresión de los genes de senescencia como p53-p21 y p16 mediante western blot. También se analizó el porcentaje de células senescentes identificadas por la actividad SA-β-gal, cuantificadas por microscopía confocal con una sonda fluorescente (5-dodecanoilaminofluoresceina di-β-D-galactopiranosido, C12FDG).

Se midió la actividad autofágica analizando los niveles de expresión de p62 y LC3II respecto a LC3I, mediante western blot. Se estudió la expresión de calpaínas 1, 2 y 3 mediante western blot. Además, se estudió la capacidad proliferativa de los mioblastos mediante el análisis del PCNA por western blot, así como el cierre de herida en placa.

2. Materiales empleados

2.1. Cultivo de células de músculo esquelético de ratón C2C12

Para la realización de los estudios se utilizaron células de ratón C2C12, que son células de mioblastos murino derivados de células satélite. Estas células se cultivaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía [21]. Las células se mantuvieron en las placas en medio DMEM (Lonza, Walkersville, M.D., EEUU), suplementado con 10% de FBS, penicilina (0,66 µg/mL) y estreptomicina sulfato (60 µg/mL) (Gibco, Paisley, Reino Unido) en una atmosfera al 5% de CO_2 y a 37°C de temperatura. El medio de cultivo se cambió cada dos días. Los experimentos se realizaron en células en pases seis a once, sembradas en placas Petri de plástico a una densidad 4×10000 células/cm^2 (para saber los mililitros necesarios que hay

que añadir en cada pocillo, se procedió al contaje de las células usando la cámara de Neubauer) en confluencia con medio DMEM sin FBS.

2.2. Reactivos

β-glicerofosfato (BGP) como donador de grupos fosfato utilizado en estudios de senescencia de células de músculo esquelético C2C12. Se utilizó a una concentración de 10 mM y se incubó a distintos tiempos. Para su preparación se pesó 0,3 g de BGP y se ha disuelto en 1 mL de agua estéril. Se hacía soluciones nuevas todas las semanas bajo condiciones de esterilidad.

Calpeptin (10 mM) como inhibidor de calpaínas.

Rapamicina (50 nM) que es inmunosupresor que inhibe la m-TOR y se usa en trasplantes.

Sonda fluorescente (5-dodecanoilaminofluoresceina di-β-D-galactopiranosido, C12FDG).

2.3. Tratamiento de células

Una vez que la placa haya tenido una confluencia del 60-80%, se procedió a deprivarlas con medio DMEM al 0% durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con BGP 10 mM a 24 y 48 horas.

3. Métodos

3.1. Análisis del contenido proteico celular mediante western blot

Una vez finalizados los tratamientos de las células, se dejaron a 4°C donde se lavaron con PBS 1× frío dos veces y a continuación se solubilizaron en un tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM PH 7,4, EDTA 1 mM, 10% v/v glicerol, KCl 100 mM, 1% Triton X-100, 0,5% v/v β-mercaptoetanol, NaF 5 mM, $NaVO_4$ 0,2 mM, $MgCl_2$ 5 mM, PMSF 1 mM, pepstatina/leupeptina/aprotinina 1 mM). La solución resultante se centrifugó a 11.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La concentración de proteínas del sobrenadante se cuantificó utilizando el método de Lowry (Bio-red, Hercules,

CA, EEUU). A las muestras se les añadió SDS 5× y fueron calentados a 95°C durante cinco minutos para conseguir la desnaturalización de las proteínas.

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida (National Diagnostic, Atlanta, GA, EEUU), de distintos porcentajes bajo condiciones reductoras en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, PH 8,3, Glicina 19,2 M y 0,1% SDS), según el peso molecular de la proteína de interés, mediante la técnica de western blot [22]. Después, las proteínas de transfirieron a membranas de PVDF (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU) por transferencia semi-seca (Tris-HCl 48 mM, PH 8,3, Glicina 19,2 M, 0,1% SDS y 20% Metanol). Las membranas se bloquearon para evitar uniones inespecíficas en TTBS con 0,1% de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) con 5% de leche (leche en polvo desnatada, Central Lechera Asturiana), durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con su correspondiente anticuerpo primario contra la proteína que se quería detectar (tabla 1) en BSA al 3%. A la mañana siguiente, tras lavar con TTBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa una hora a temperatura ambiente (tabla 1). Por ultimo las membranas se lavaron de nuevo con TTBS y se revelaron utilizando ECL Western Blotting detection reagents (Thermo Scientific, Rockford. IL, EEUU) y la exposición a películas X-OMAT (Kodak, Rochester, NY, EEUU).

Anticuerpo Primario	Casa Comercial (Referencia)	Anticuerpo Secundario
p53 (1:1000)	Sigma-Aldrich (SAB4503001)	Mouse (1:2000) (DAKO p0260)
p21 (1:500)	BD biosciences (556430)	Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)
p16 (1:1000)	Abcam (3562-1)	Mouse (1:2000) (DAKO p0260)
Calpaína 1 (1:1000)	Abcam (7462-5)	Rabbit (1:5000) (Chemicon AP462P)
Calpaína 2 (1:1000)	Abcam (9518-5)	Rabbit (1:5000) (Chemicon AP432P)

Calpaína 3 (1:1000)	Abcam (7621-7)	Rabbit (1:5000) (Chemicon AP462P)
LC3I, LC3II (1:1000)	BD biosciences (965410)	Rabbit (1:5000) (Chemicon AP462P)
p62 (1:500)	Cell Signaling (9461)	Rabbit (1:5000) (Chemicon AP462P)
PCNA (1:500)	Cell Signaling (2880)	Mouse (1:2000) (DAKO p0260)
GAPDH (1:1000)	Sigma-Aldrich (G8795)	Mouse (1:2000) (DAKO p0260)

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para western blot

3.2. Medida de la actividad β-galactosidasa por microscopía confocal

Para poder determinar la actividad de β-galactosidasa se utilizó como sustrato la β-galactosidasa 5-dodecanilaminofluoresceina di-β-galactopiranosido (C12FDG; Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido).

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos circulares de cristal estériles (Microscope Cover Glass 12 mm, Thermo Scientific, Chicago, IL, EEUU). Tras el tratamiento correspondiente, las células se incubaron con C12FDG a una concentración de 33 µM durante dos horas. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1× y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1× durante 15 minutos. A continuación, las células se lavaron de nuevo dos veces con PBS 1× y fueron montadas con un líquido de montaje ProLong RG old antifade Reagement (Invitrogen Ltd, Paisley, reino Unido) que contiene DAPI para la tinción de los núcleos. Las muestras se observaron en un microscopio confocal LEICA TCS-SP5 (Leica Microsystem; Wetzlar, Alemania) utilizando un láser de excitación a 488 nm que detecta la sonda fluorescente y un diodo de 405 nm que detecta DAPI. Las imágenes capturadas se analizaron mediante el uso del programa ImageJ donde se midió la densidad de fluorescencia por densitometría. Los resultados se mostraron en forma de tanto por ciento frente al control.

3.3. Cierre de herida

Las células se trataron con BGP 10 mM en medio DMEM al 0% durante 48 horas. Después del tratamiento, se hizo una herida en las células contenidas en la placa con la ayuda de una punta estéril y a través del microscopio se pudo hacer fotos para ver el estado inicial de la herida (cero horas). Las placas se dejaron un día, y después, se hicieron otras fotos a 24 horas, para ver como se ha cerrado la herida en presencia del BGP.

4. Análisis estadístico

Los resultados se mostraron como tanto por ciento con respecto al control y constituyeron la media ± el error estándar de una n de tres experimentos. Los valores densitométricos de los western-blot se corrigieron por la variación de carga de las correspondientes densidades de las bandas de GAPDH. Para comparar los valores respecto del control se usó el test de Dunnet. $P<0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

VII. RESULTADOS

1. El β-glicerofosfato induce senescencia en mioblastos de músculo esquelético a través de las vías p53 y p16^{INK4a}

Se utilizó el BGP como fuente exógena de fosfato. En primer lugar, se analizaron las vías de senescencia implicadas en presencia del BGP. Se analizó la expresión de p53 y su diana transcripcional p21 mediante western-blot. En el caso de p53 el BGP produjo un aumento en su expresión de forma tiempo-dependiente a partir de las 24h de tratamiento. Los niveles de p21 también aumentaron con el tratamiento de forma tiempo-dependiente a partir de las 24h. En el caso de p16^{INK4a}, el tratamiento con BGP no produjo un aumento significativo (figura 1).

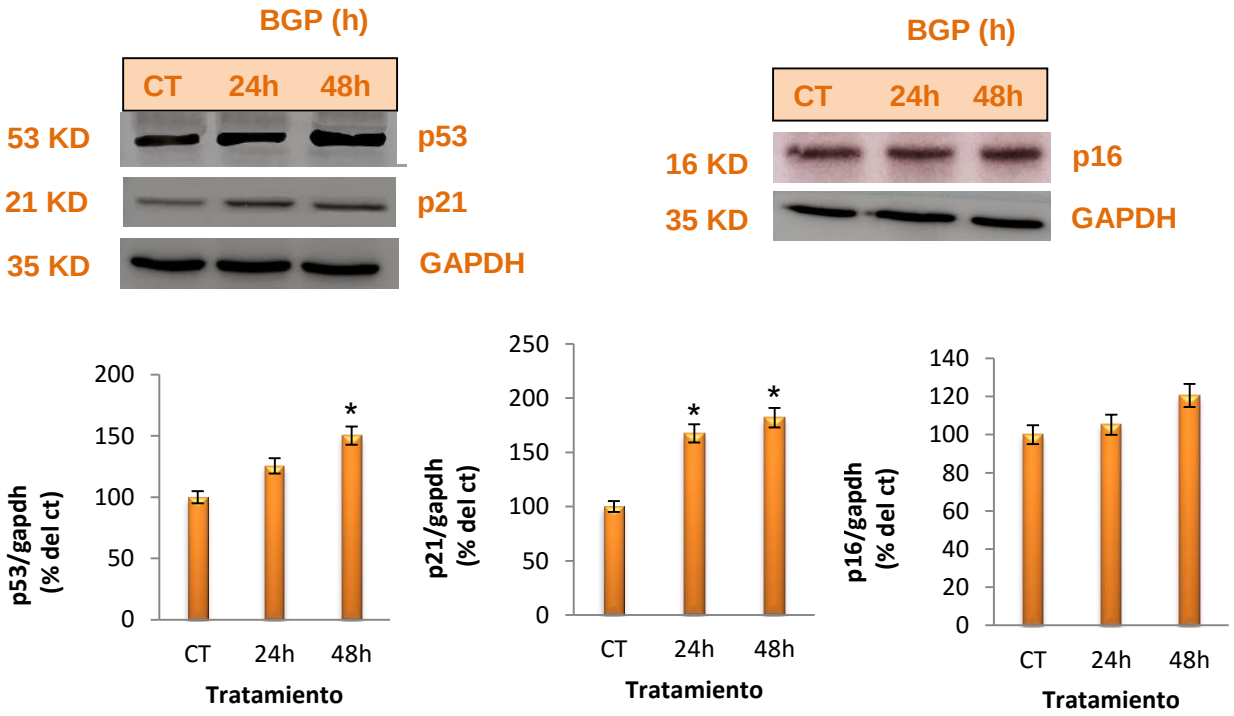
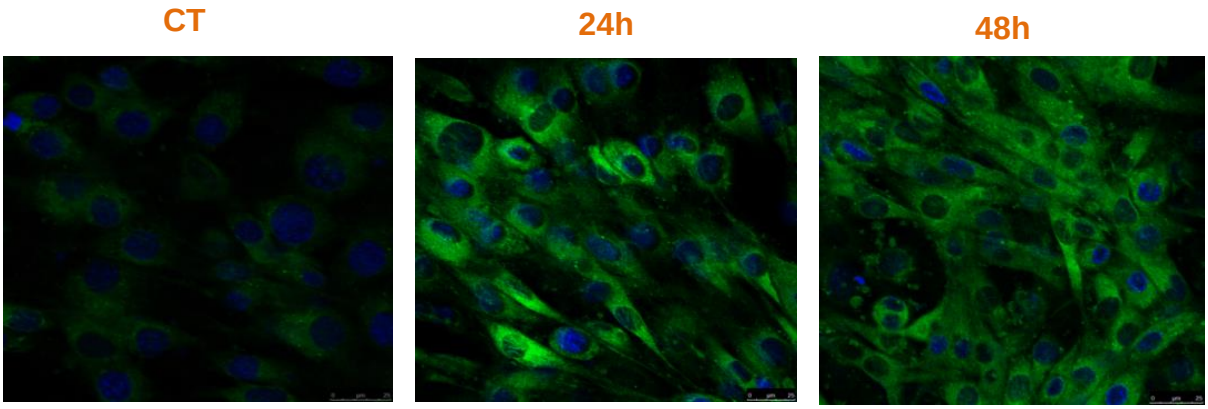


Figura 1. El tratamiento con β-glicerofosfato induce senescencia vía p53 y p16^{INK4a}. Determinación de los niveles de p53, p21 y p16^{INK4a} en C2C12 tratadas con BGP 10 mM a distintos tiempos. Las figuras de arriba muestran un blot representativo. Las figuras de abajo muestran un análisis densitométrico. Los resultados son la media ± error estándar de 3 experimentos. *p<0,05 vs control.

A continuación, se determinó si el BGP induce senescencia en C2C12 mediante tinción con β-galactosidasa. Para ello se trataron las células con BGP 10 mM a 24 y 48h. La actividad β-galactosidasa se midió por microscopía confocal. La actividad se incrementó de forma tiempo-dependiente presentando un máximo a las 48h de tratamiento (figura 2).



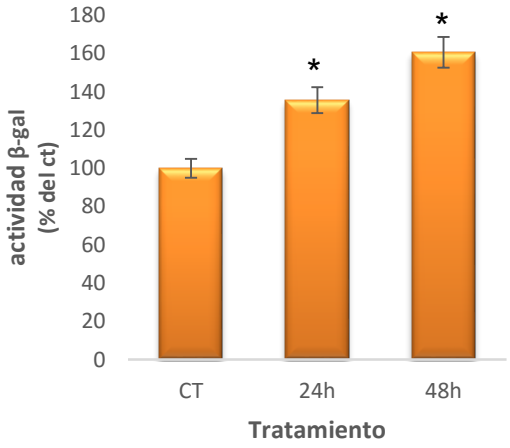


Figura 2. El β-glicerofosfato induce senescencia en C2C12. Análisis de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia en C2C12 tratadas con BGP 10 mM. Arriba, se muestran imágenes representativas de cada uno de los tiempos de tratamiento. Abajo, se muestra análisis densitométrico. Los resultados son la media ± error estándar de 3 experimentos. *p<0,05 vs control.

1. El β-glicerofosfato induce disminución de la actividad autofágica

Al igual que el experimento anterior, se utilizó el BGP como fuente exógena de fosfato. Para ver la actividad autofágica, se analizó la expresión de p62 y LC3II/LC3I mediante western-blot. En el caso de p62, el BGP produjo un aumento en su expresión de forma tiempo-dependiente a partir de las 24h de tratamiento. Los niveles de LC3II/LC3I también aumentaron con el tratamiento (figura 3).

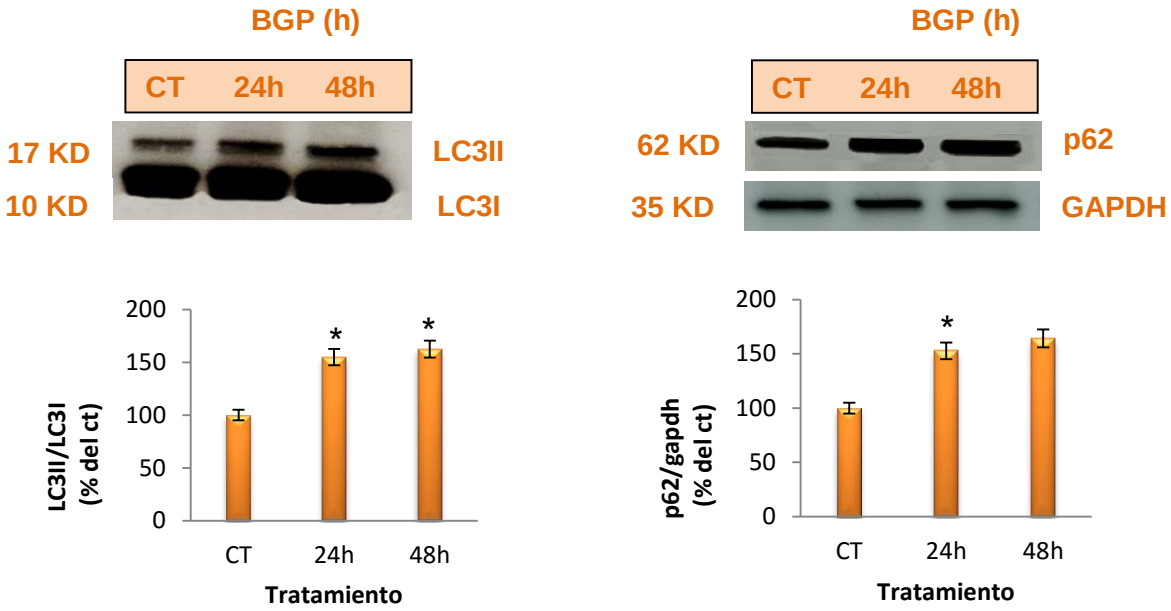


Figura 3. El tratamiento con β-glicerofosfato disminuye la actividad autofágica. Determinación de los niveles de p62 y LC3II/LC3I en C2C12 tratadas con BGP 10 mM a distintos tiempos. Las figuras de arriba muestran un blot representativo. Las figuras de abajo muestran análisis densitométrico. Los resultados son la media ± error estándar de 3 experimentos. *p<0,05 vs control.

Para comprobar si el aumento de la actividad SA-β-gal era consecuencia de la disminución de la actividad autofagica asociada a los altos niveles de fosfato se usó un inhibidor de la m-TOR, la rapamicina 50 nM (figura 4).

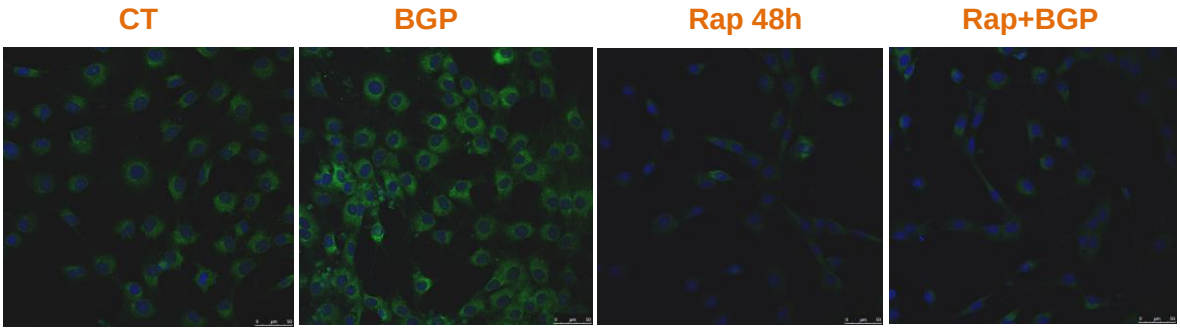


Figura 4. La rapamicina previene la senescencia inducida por β-glicerofosfato. Determinación de la actividad β-galactosidasa en C2C12 tratadas con rapamicina 50 nM y BGP 10 mM durante 48h.

2. El β-glicerofosfato induce incremento en el sistema de calpaínas

Para estudiar si los altos niveles de fosfato producían un incremento en el sistema de calpaínas (responsables de la degradación proteica), las células se trataron con BGP 10 mM. Se analizó la expresión de calpaína 1, calpaína 2 y calpaína 3 mediante western blot. Los tres tipos de calpaínas mostraron un aumento de forma tiempo-dependiente a partir de las 24h (figura 5).

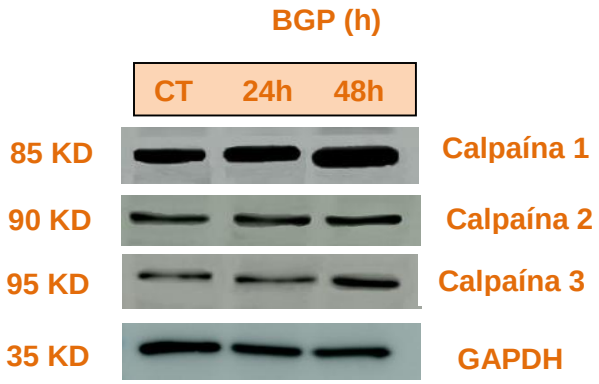
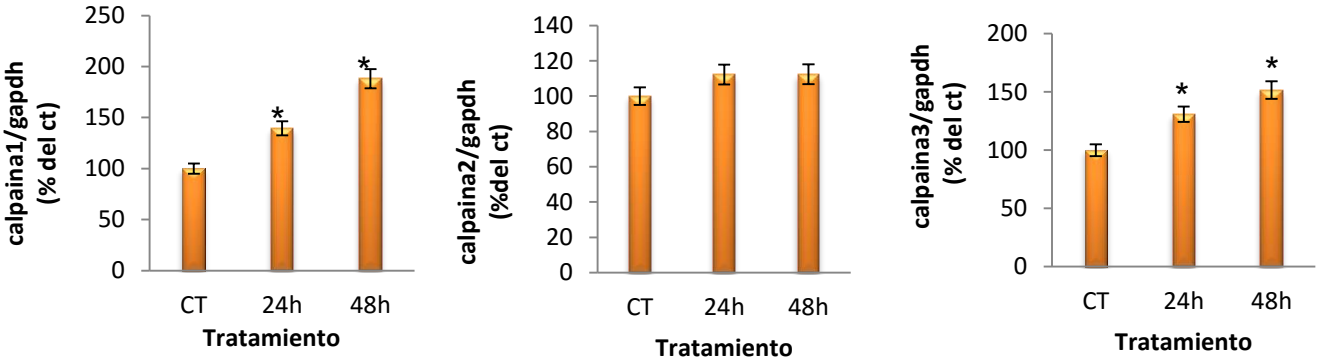


Figura 5. El tratamiento con β-glicerofosfato induce incremento en el sistema de calpaínas. Determinación de los niveles de calpaína 1, 2 y 3 en C2C12 tratadas con BGP 10 mM a distintos tiempos. A la izquierda muestran un blot representativo. Abajo muestra análisis densitométrico. Los resultados son la media ± error estándar de 3 experimentos. *p<0,05 vs control.



Para comprobar si el aumento de la actividad SA-β-gal era específico de los altos niveles de fosfato se usó un inhibidor de calpaínas, el calpeptin. Cuando las células fueron tratadas con el calpeptin 10 mM, se previno el aumento de la actividad β-galactosidasa inducida por BGP (figura 6).

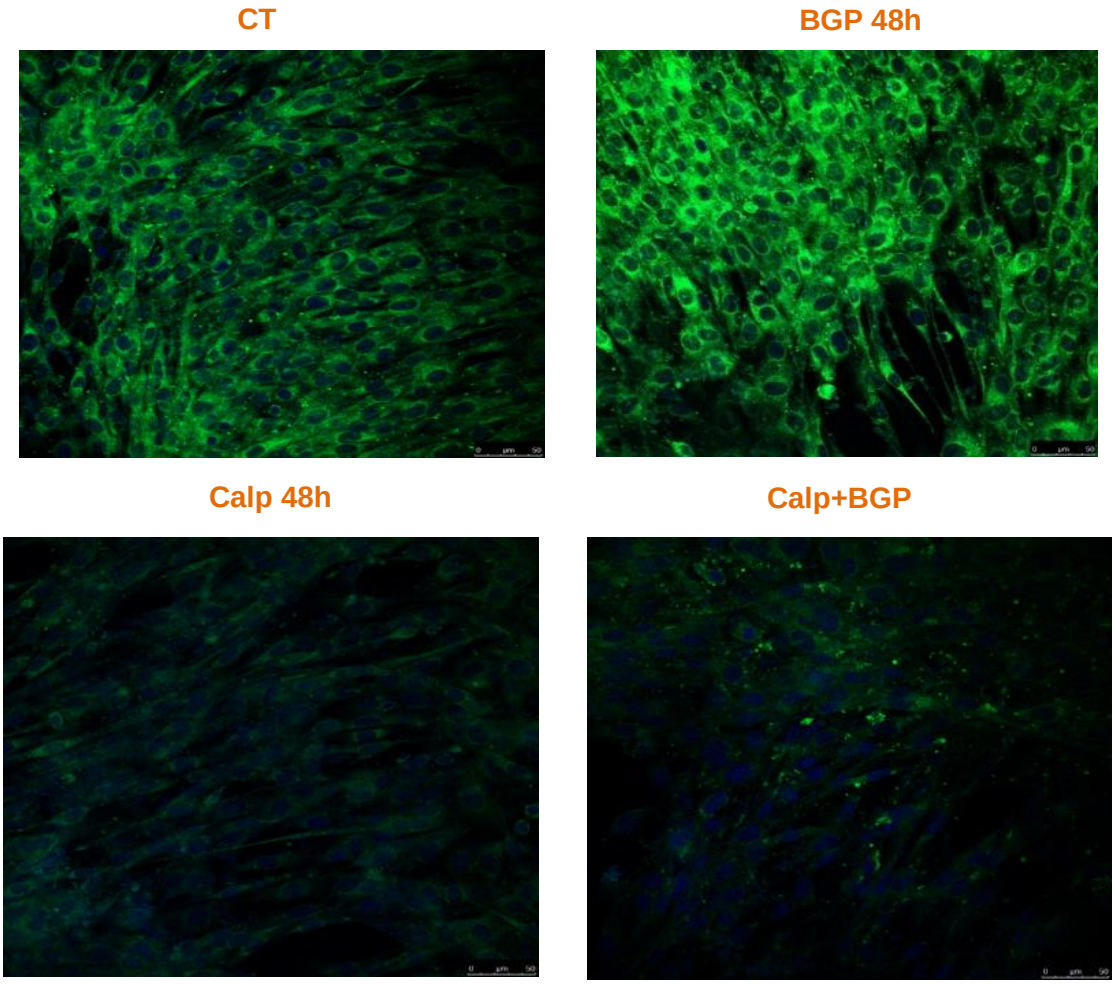


Figura 6. El calpeptin previene la senescencia inducida por β-glicerofosfato. Determinación de la actividad β-galactosidasa en C2C12 tratadas con calpeptin 10 mM y BGP 10 mM durante 48h.

3. El β-glicerofosfato reduce la capacidad proliferativa de mioblastos

Para investigar cómo el fosfato reducía la capacidad proliferativa de mioblastos, se utilizó el BGP como donador de fosfato. Se analizó la expresión del PCNA mediante western blot y se determinó el cierre de herida en placa. En el caso de PCNA, el BGP produjo una disminución en su expresión de forma tiempo-dependiente a partir de 24h (figura 7). En el caso de cierre de herida, se observó

que las células tratadas con BGP tenían menos capacidad para cerrar la herida que las células que han estado sin tratamiento (figura 7).

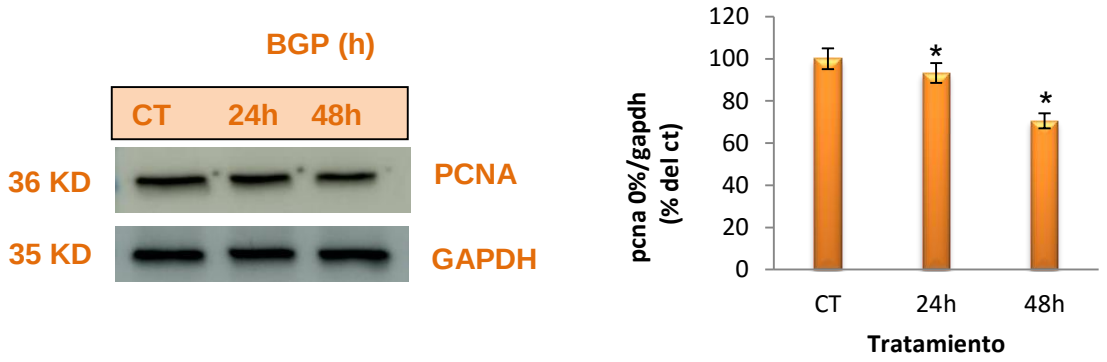


Figura 7. El tratamiento con β-glicerofosfato reduce la expresión de PCNA. Determinación de los niveles de PCNA en C2C12 tratadas con BGP 10 mM a distintos tiempos. A la izquierda muestra un blot representativo. A la derecha muestra análisis densitométrico. Los resultados son la media ± error estándar de 3 experimentos. *p<0,05 vs control.

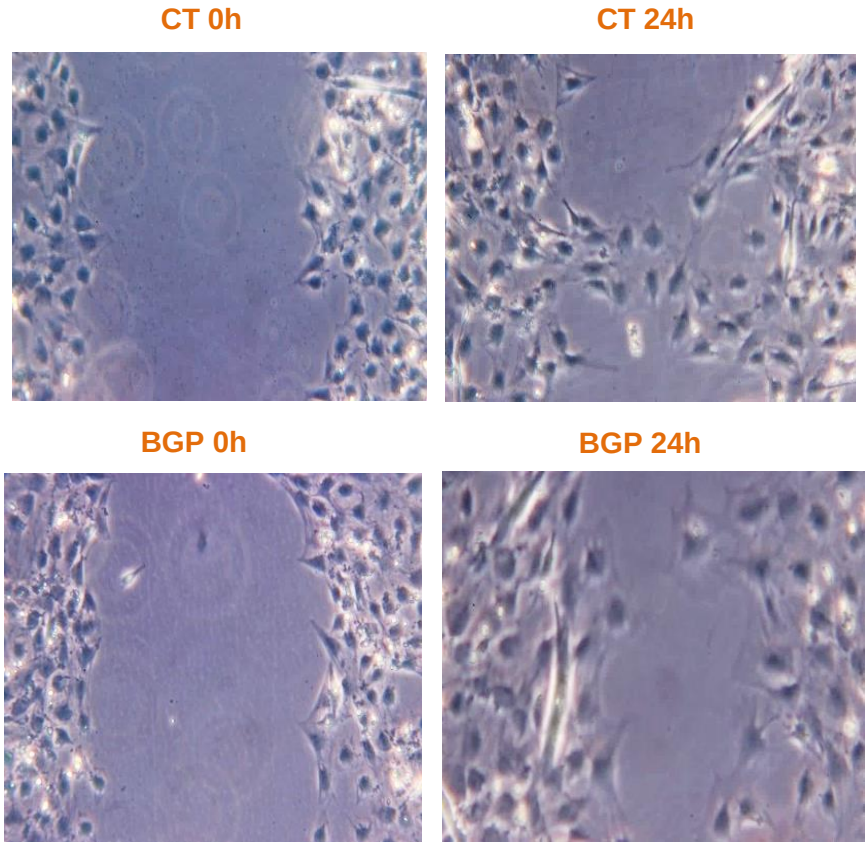


Figura 7. El tratamiento con β-glicerofosfato reduce la capacidad de cierre de herida de mioblastos. Determinación de la capacidad de cierre de herida en C2C12 tratadas con BGP 10 mM a distintos tiempos. Las fotos de arriba muestran las C2C12 sin tratar. Las fotos de abajo muestran las C2C12 tratadas con BGP durante 48h.

VIII. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un factor de riesgo importante en el desarrollo de diversas enfermedades relacionadas con la edad, como es el caso de la sarcopenia. En la sarcopenia hay una disminución significativa en el contenido de células satélite.

Los experimentos se han realizado en células C2C12 (mioblastos), estudiándose como la hiperfosfatemia afecta a estas células. Los mioblastos son un estadio intermedio entre las células satélite y el miotubo.

Las células satélites son células madres musculares capaces de llevar a cabo divisiones celulares tanto simétricas como asimétricas, además de autorenovación y diferenciación. Las células satélites se encuentran en un estado quiescente (fase G_0), donde esperan la señal para responder y formar nuevas fibras musculares cuando es necesario. Estas células al recibir la señal, proliferan formando los mioblastos que, de manera terminal, se diferenciarán al fusionarse unos con otros y formarán nuevas fibras musculares (miotubos), o bien, se unirán a fibras dañadas para reparar las ya existentes [23]. Una proporción de mioblastos que no pretende alcanzar la diferenciación terminal se mantiene en un estado primitivo y continúa con la autorenovación, de manera que se siga manteniendo una cantidad de células madre que pueda volverse a activar frente a futuras demandas. Como resultado, debe existir un microambiente que provea a las células satélite un nicho especializado que dirija todas las señales que controlan la quiescencia, coordinar la proliferación celular para mantener la reserva de células madre y, al mismo tiempo, preservar las propiedades de autorenovación y la capacidad de diferenciarse en tejido muscular esquelético [24]. Se han descrito situaciones en las que ese microambiente induce senescencia en las células satélites, disminuyéndose la capacidad de regeneración muscular. En este trabajo se ha demostrado que la hiperfosfatemia podría ser una de ellas.

1. La hiperfosfatemia induce el envejecimiento

El fosfato es un elemento fundamental para muchos procesos celulares, sin embargo, las altas concentraciones de fosfato se han relacionado con diversas patologías relacionadas con la edad. Aunque se conoce poco sobre los efectos directos del fosfato en el envejecimiento, hay estudios en los que se ha podido observar que existe correlación inversa entre la longevidad y los niveles de fosfato en sangre de mamíferos [20]. Por otro lado, modelos animales de envejecimiento prematuro, como son el ratón deficiente en Klotho y FGF23, presentan múltiples trastornos similares a los que tienen lugar durante el proceso de envejecimiento: Retraso en el crecimiento, calcificación vascular, osteodistrofia, sarcopenia, etc. acompañados de elevados niveles de fosfato en sangre. Se ha demostrado que el fenotipo de envejecimiento precoz puede ser revertido en ambos modelos eliminando la hiperfosfatemia con una dieta baja en fosfato [20].

En este trabajo se ha utilizado el BGP como donador de fosfato extracelular, y se ha investigado si la hiperfosfatemia induce senescencia celular en C2C12, explorándose, además, los mecanismos intracelulares involucrados.

2. La hiperfosfatemia induce senescencia por aumento en la expresión de p53-p21 y la actividad β-galactosidasa

Para analizar si los hiperfosfatemia inducía senescencia celular a nivel del músculo esquelético y qué mecanismos podían estar implicados en este proceso, se han estudiado la expresión de los inhibidores del ciclo celular (p53-p21 y p16) y la actividad SA-β gal. Estudios previos han mostrado que la expresión de p53-p21 y la actividad β-galactosidasa se encuentran aumentadas en organismo viejos [25]. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con esos estudios, ya que tanto la expresión de p53-p21 como la actividad de SA-β gal se han visto aumentados en presencia del BGP, lo que sugiere que la hiperfosfatemia es un inductor de senescencia celular.

3. La hiperfosfatemia induce senescencia por alteración de los mecanismos de la homeostasis proteica

Analizando los mecanismos por los cuales la hiperfosfatemia inducía senescencia, se ha estudiado la homeostasis proteica (calpaínas y autofagia). El aumento de expresión de calpaínas 1, 2 y 3 se ha relacionado con la distrofia muscular debido a la degradación de proteínas del sarcómero [26]. Los resultados obtenidos en este estudio han mostrado que la exposición a BGP aumenta la expresión de calpaínas 1, 2 y 3. Además, cuando se utilizó el calpeptin (inhibidor de calpaínas) no se observó aumento en la actividad β-galactosidasa en respuesta a la presencia del BGP, por lo cual se deduce que el aumento en la expresión de calpaínas, como consecuencia de la hiperfosfatemia, induce senescencia.

La autofagia es otro mecanismo para el mantenimiento de la homeostasis proteica ya que regula la degradación de proteínas y la proliferación celular. Estudios recientes han demostrado que la activación de la m-TOR disminuye la actividad autofágica conllevando a la aparición de fenotipo senescente semejante al de los organismos viejos [27]. Los resultados han mostrado que la exposición a BGP está asociada a una disminución de la actividad autofágica, ya que los marcadores de autofagia (p62 y LC3II) se han visto aumentados. Por lo cual la hiperfosfatemia, por un mecanismo que se está investigando en nuestro grupo, produce un aumento de la m-TOR (dato no demostrado), afectando negativamente sobre la autofagia. Como consecuencia de este proceso, las proteínas y orgánulos dañados se acumulan en la célula haciéndola entrar en senescencia.

En presencia de rapamicina no se observó aumento en la actividad β-galactosidasa en respuesta a la presencia del BGP, mostrando que la inhibición de la m-TOR, con la consiguiente activación de autofagia, puede revertir la senescencia celular.

4. La hiperfosfatemia afecta a la proliferación celular

El antígeno de proliferación celular (PCNA) es una proteína nuclear cuya función es la replicación del ADN celular, actuando como enzima auxiliar de la

enzima ADN polimerasa delta. Además, tiene un papel clave en la respuesta al daño al ADN, por estar implicado en la replicación con su consiguiente reparación [28].

La función principal de la célula satélite es regenerar el músculo ante un daño. Cuando la célula es senescente, ésta no puede proliferar.

Los resultados obtenidos han demostrado que la hiperfosfatemia impide la proliferación, ya que los niveles de PCNA obtenidos han disminuido en presencia del BGP. Además, la capacidad de cierre de herida es menor en presencia del BGP. Todo esto podría suponer un paso más hacia la aparición de sarcopenia.

IX. CONCLUSIÓN

Basándose en los resultados obtenidos en este trabajo se han llegado a las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que la hiperfosfatemia induce senescencia en las células satélite del músculo esquelético a través del aumento en la expresión de la vía p53-p21.

2. La hiperfosfatemia induce senescencia por un proceso que disminuye la actividad autofágica y por otro proceso que implica un aumento en la expresión del sistema de calpaínas.

3. La hiperfosfatemia induce senescencia y como consecuencia se reduce la capacidad proliferativa de células y su capacidad para cerrar heridas, impidiendo la proliferación de mioblastos y por tanto interrumpiendo los procesos de regeneración muscular.

X. BIBLIOGRAFÍA

1) Sourdet S and Castanedo JF. *Frailty and aging.* J Nutr Health Aging. 2012; 16(4):283-4.

2) Doherty TJ. *Aging and sarcopenia*. J Appl Physiol. 2003; 95: 1717-1727.

3) Gopinath SD, Rando TA. *Aging of the skeletal muscle stem cell niche*. Aging cell. 2008; 7: 590-598.

4) Hayflick L, Moorhead PS. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res. 1961; 25: 585-621.

5) Wright WE, Shay JW. *Historical claims and current interpretations of replicative aging*. Nat Biotechnol 2002; 20 (7): 682-688.

6) Lloyd AC. *Limits to lifespan*. Nat Cell Biol 2002; 4 (2): 25-27.

7) Korenjak M., Brehm A. *E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development*. Curr Opin Genet Dev. 2005; 15 (5): 520-527.

8) Sherr CJ, McCormick F. *The RB and p53 pathways in cancer*. Cancer Cell. 2002 2 (2): 103-112.

9) Vandenberk B, Brouwers B, Hatse S, Wildiers H. *p16INK4a: A central player in celular senescence and a promising aging biomarker in elderly cancer patients*. Journal of geriatric oncology. 2011; 6: 259-269.

10) Smith JR, Pereira-Smith OM. *Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression*. Science. 1996; 273: 63-70.

11) Mizushima N, Klionsky DJ. *Protein turnover via autophagy: implications for metabolism*. Annual Rev Nutr. 2007. 27: 19-40.

12) Cuervo AM. *The plasma membrane brings autophagosomes to life*. Nat Cell Biol. 2010; 12 (8): 735-737.

13) Komatsu M, Ichimura Y. *Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy*. FEBS Letters. 2010; 584 (7): 1374.

14) Sousa-Victor P, Muñoz Cànoves P. *Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence*. Nature. 2014; 506: 316-321.

15) Croall DE, De Marino GN. *Calcium-activated neutral protease (calpain) system: Structure, function and regulation*. Physiol.Rev. 1991; 71: 813-847.

16) Zatz M and Starling A. Calpains and diseases. N Engl J Med 2005; 352: 2413-2415.

17) Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. *Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes*. Annu Rev Biochem. 1996; 65: 801-847.

18) Husom AD, Peters EA, Kolling EA, Fugere NA*. Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle*. Arch Biochem Biophys, 2004; 421: 67-76.

19) Gattineni J, Baum M. *Genetic disorders of phosphate regulation*. Pediatr Nephrol. 2012; 27 (9): 1477-1487.

20) Shiizaki K, Kuro-o M. *A potential link between phosphate and aging*. Clin Calcium. 2012; 22 (10): 1493-1498.

21) Diez-Marques ML, Garcia-Escribano C, Medina J, Boyano-Adanez MC, Arilla E, Torrecilla G, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. *Effects of somatostatin on cultured human mesangial cells*. Endocrinology. 1995; 136 (8): 3444-3451.

22) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Biotechnology. 1992; 24: 145-149.

23) Hawke TJ, Garry DJ. *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol, 2001; 91: 534–551.

24) Wagers AJ, Conboy IM. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. Cell, 2005; 122: 659-667.

25) Zhou XJ, Rakheja D, Yu X, Saxena R, Vaziri ND, Silva FG. *The aging kidney*. Kidney Int. 2008; 74 (6): 710-720.

26) Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse, F, C. *Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. Cell. 1995; 81: 27-40.

27) Madeo F, Tavernarakis N. *Can autophagy promote longevity?* Nat Cell Biol. 2010; 12 (9): 842- 846.

28) Jaskulski D, De Riel JK, Mercer WE, Calabretta B. *Inhibition of cellular proliferation by antisence oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin*. Science. 1988; 240: 1544-1546.