

## LA RUTA MTOR/P70S6K EN EL METABOLISMO DE PROTEÍNAS: CARENCIA DE ESTUDIOS EN EL DIAFRAGMA.

### THE MTOR/P70S6K PATHWAY ON THE PROTEIN METABOLISM: LACK OF STUDIES IN THE DIAPHRAGM.

M. ESCOBAR CABELLO<sup>A</sup> & J.L. MÁRQUEZ ANDRADE<sup>A,B</sup>

#### RESUMEN

Tanto la síntesis como la degradación de proteínas son procesos esenciales en la respuesta del músculo esquelético frente al ejercicio físico. La regulación molecular de estos procesos ha mostrado estar relacionada con mTOR, una proteína kinasa clave, que simultáneamente sensa el estado energético, nutricional y el estrés celular. mTOR forma parte de complejos proteicos, los cuales son activados por múltiples estímulos, incluidos el estrés mecánico y metabólico, por lo cual resulta relevante conocer su comportamiento en condiciones de sobrecarga muscular. A pesar de los avances recientes en el conocimiento de las rutas de señalización que involucran a esta proteína, poco es lo que se conoce respecto de su respuesta en el diafragma, músculo que es repetidamente expuesto a condiciones de estrés, particularmente en presencia de disfunción ventilatoria aguda o crónica. En esta revisión abordaremos las características moleculares de esta proteína, su interacción con p70S6K y su participación en la respuesta diafragmática al ejercicio intenso.

**Palabras clave:** proteína mTOR, proteína p70S6K, ejercicio intenso, diafragma.

#### ABSTRACT

*Both synthesis and degradation of proteins are essential processes in skeletal muscle response to physical exercise. The molecular regulation of these events have shown to be related to mTOR, a pivot protein kinase who sense energetic, nutritional and stress status. mTOR is the catalytic subunit of two distinct complexes activated by multiple stimuli, a reason for which is important to know its response in conditions of muscular overload.*

*Despite of the advances in the knowledge of the signalling pathways involving mTOR, the response of diaphragm in exercise is not well understood. In this revision we attempted to describe the molecular characteristics of this protein, its interaction with p70S6K, and its participation in the diaphragmatic response to intense exercise.*

**Key words:** mTOR protein, p70S6K protein, intense exercise, diaphragm.

#### INTRODUCCIÓN

El estrés mecánico es fundamental para el desarrollo y la mantención de la función de la musculatura esquelética<sup>1-4</sup> y existe evidencia que tanto el ejercicio exhaustivo como la elongación inducen respuestas hipertróficas<sup>5, 6</sup>. El incremento desmedido de las cargas de trabajo puede inducir daño, especialmente en las fibras musculares de contracción rápida, las cuales experimentan rupturas sarco-

lémicas y de los discos Z, además de la desestabilización de proteínas estructurales asociadas a la sarcómera<sup>7</sup>. Este daño ultraestructural ha sido asociado con desbalances en la velocidad de acortamiento entre sarcómeros adyacentes, lo cual resulta ser particularmente importante en esfuerzos musculares intensos de tipo excéntrico<sup>8</sup>.

Cargas de menor intensidad pero sostenidas en el tiempo

han mostrado generar un estrés metabólico en el músculo, lo cual se ha asociado con alteraciones en el acoplamiento excitación-contracción y con disfunción del retículo sarcoplasmático<sup>9</sup>. Las alteraciones funcionales o estructurales del retículo sarcoplasmático, conducen a un desequilibrio entre la liberación y la recaptación de calcio, con el consecuente aumento de sus niveles intracelulares, llevando a la activación de procesos catabólicos<sup>10</sup>. Un ejemplo de esto es la activación de Calpaína 3, un mediador de la degradación del aparato miofibrilar que actúa sobre filamentos de Desmina y Actina, iniciando el desensamblaje de proteínas estructurales<sup>11</sup>, las cuales posteriormente son degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma<sup>12</sup>. Este mecanismo derivado de una sobrecarga metabólica, podría explicar el daño provocado en la musculatura ventilatoria durante periodos de sobrecarga prolongada<sup>13, 14</sup>.

La respuesta inflamatoria y los procesos de reparación y regeneración muscular son esenciales para devolver la integridad y funcionalidad a los tejidos comprometidos. La inflamación promueve un daño secundario a la injuria original por medio de mecanismos superóxido dependientes y de la fagocitosis, al tiempo que promueve la reparación, a través de acciones inducidas por factores de crecimiento liberados por las células inflamatorias<sup>15, 16</sup>, lo cual finalmente estimula la regeneración del músculo esquelético en un proceso caracterizado por la activación de células satélites, proliferación de células precursoras musculares (MPC, del inglés myogenic precursor cells) y por la diferenciación de éstas mismas hacia células musculares<sup>17, 18</sup>.

El daño y los procesos de reparación y regeneración muscular se asocian directamente con la degradación y síntesis de proteínas en un proceso que se superpone en el tiempo e involucra proteínas clásicamente asociadas al control del metabolismo y el crecimiento celular, como PI3K, Akt, mTOR y p70S6K.

El diafragma, el mayor músculo ventilatorio, desempeña un rol crítico en condiciones que involucran disfunción ventilatoria, como ocurre frente a una disminución de la distensibilidad pulmonar o en presencia de una obstrucción de la vía aérea, situaciones en las cuales es sometido a variadas intensidades de sobrecarga y donde su respuesta compensatoria puede hacer la diferencia entre la vida y la muerte.

Desde el punto de vista molecular, las respuestas evocadas por la sobregarga mecánica o metabólica en el diafragma son insuficientemente conocidas, sin embargo, parecen compartir con los músculos esqueléticos apendiculares algunas rutas esenciales que permiten mantener un

adecuado equilibrio entre la síntesis y degradación de proteínas<sup>19, 20</sup>.

## mTOR Y SUS PROTEÍNAS ASOCIADAS

mTOR es un regulador central del metabolismo, crecimiento, proliferación y supervivencia celular. El producto proteico del gen MTOR da origen a una proteína serina/treonina kinasa, compuesta por 2549 aminoácidos y una masa de 289 kDa<sup>21</sup>. Presenta una terminal amino de repeticiones HEAT (del inglés, huntingtin elongation factor 3a subunit of protein phosphatase 2A and TOR1), un dominio central FAT (del inglés, focal adhesion target), un dominio FRB (del inglés, FKBP12-rapamycin binding), un dominio con actividad kinasa y un dominio FATC (del inglés, carboxy-terminal homology domain)<sup>22</sup> (**Figura 1**).

Funcionalmente mTOR forma parte del centro catalítico de dos posibles complejos proteicos, conocidos como mTORC1 y mTORC2, los cuales se diferencian por las proteínas asociadas<sup>23</sup>.

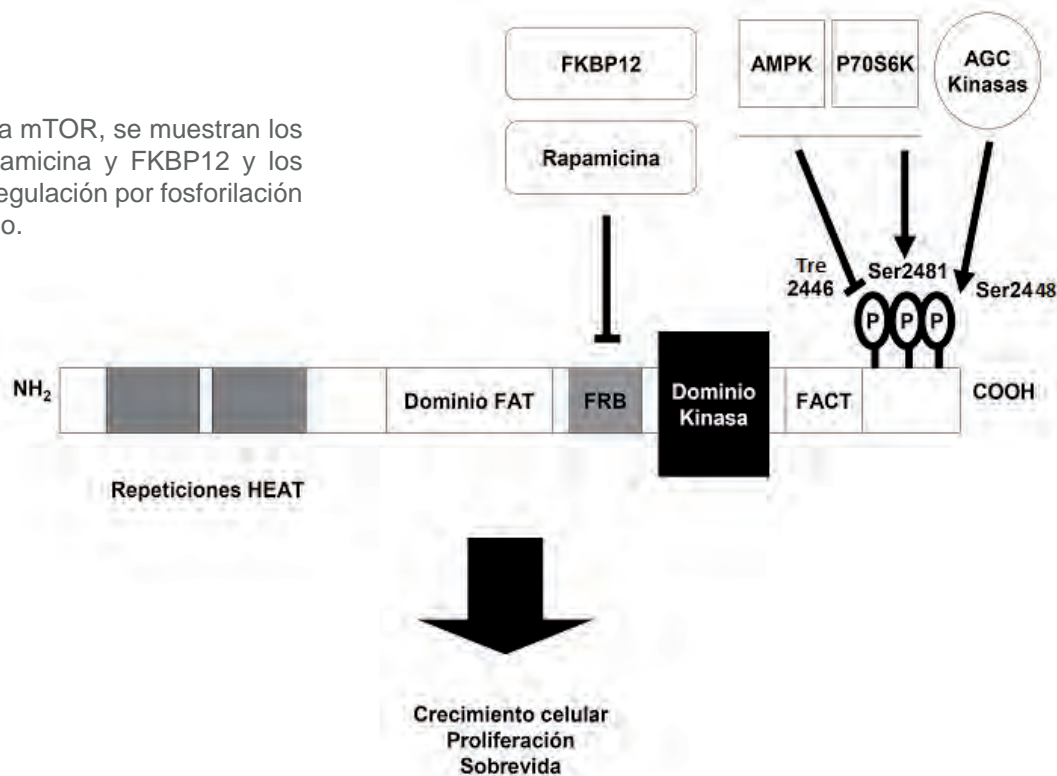
El complejo mTORC1 (**Figura 2**) presenta cinco componentes: mTOR (que es la subunidad catalítica del complejo); RAPTOR (del inglés, regulatory-associated protein of mTOR); mLST8 (del inglés, mammalian lethal with Sec13 protein 8, también conocida como GβL); PRAS40 (del inglés, proline-rich AKT substrate 40kDa) y DEPTOR (del inglés, DEP-domain-containing mTOR-interacting protein), la función exacta de cada una de estas proteínas asociadas no es completamente conocida<sup>21</sup>. Sin embargo, existen antecedentes que asocian a RAPTOR y mLST8 con la estimulación de la actividad del complejo mTORC1<sup>24, 25</sup>, en tanto que PRAS40 y DEPTOR han mostrado actuar como reguladores negativos<sup>25, 26, 27</sup>.

Tras la activación de mTOR, tanto PRAS40 como DEPTOR son fosforiladas, lo cual reduce su interacción física con el complejo mTORC1, disociándose de éste y facilitando la activación de sus blancos corriente abajo<sup>21</sup>.

El complejo mTORC2 (**Figura 3**) está compuesto por seis proteínas: mTOR, RICTOR (del inglés, Rapamycin-Insensitive Companion mTOR) que torna al complejo insensible a rapamicina<sup>23</sup>; mSIN1 (del inglés, mammalian stress-activated protein kinase interacting protein); PROTOR (del inglés, Protein observed with Rictor); mLST8 y DEPTOR<sup>27</sup>. Aunque la función de mTORC2 permanece poco conocida, se ha descrito como un regulador corriente arriba de Akt (también conocida como proteína kinasa B) con capacidad para fosforilarla en su residuo Ser473 y en conjunto con PDK1 (del

**Figura 1**

Estructura de la kinasa mTOR, se muestran los sitios de unión a rapamicina y FKBP12 y los potenciales sitios de regulación por fosforilación en el extremo carboxilo.



inglés, phosphoinositide dependent kinase-1) en su residuo Tre308, logrando con esto la activación completa de esta kinasa, la cual finalmente regula una amplia variedad de blancos corriente abajo<sup>28</sup> entre ellos SGK1 (del inglés, serum-and glucocorticoid inducible kinase-1) y PKC $\alpha$  sugiriendo la participación de mTORC2 en los procesos de reorganización del citoesqueleto<sup>29</sup>.

para entender los procesos de adaptación del músculo esquelético a las demandas físicas, en particular la respuesta al daño por sobrecarga y la hipertrofia muscular<sup>16, 37, 38</sup>.

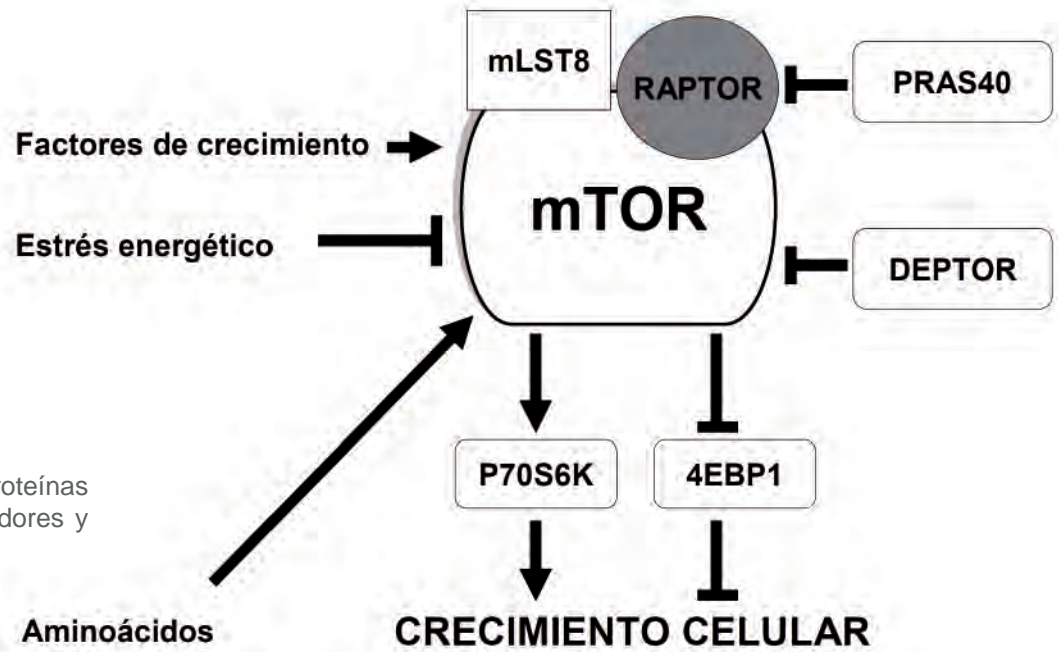
## mTORC1 COMO REGULADOR CENTRAL

El complejo mTORC1 promueve la traducción de mRNA e inhibe la autofagia<sup>30</sup>, integrando señales generadas por aminoácidos, insulina y factores de crecimiento insulino similares (IGFs)<sup>31, 32, 33</sup>, AMP y otros estímulos como hipoxia y daño de DNA<sup>34</sup>. También ha sido descrito un rol de mTORC1 como regulador de la síntesis y metabolismo de lípidos, en un mecanismo asociado a la activación de la proteína 1 de unión a elementos reguladores de esteroles (SREBP1) y del receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma (PPAR $\gamma$ )<sup>21, 35</sup>.

Los estímulos mecánicos generados en las fibras musculares durante la contracción o el estiramiento muscular, pueden estimular al complejo mTORC1, en un mecanismo que asocia complejos de adhesión con el aparato contráctil, conectando al sarcolema con la matriz extracelular. Los mecanismos por los cuales estas cargas mecánicas activan la cascada son sólo parcialmente conocidos<sup>3, 36</sup>, no obstante, la participación de mTOR parece ser fundamental para regular estos eventos, transformándose en una proteína clave

## REGULADORES CORRIENTE ARRIBA DE mTORC1

La regulación de mTORC1, es controlada por diversas proteínas corriente arriba incluyendo PI3K, Akt y la ruta Ras-ERK. Estas proteínas activan el complejo mTORC1 a través de la inhibición del complejo supresor de tumores TSC1/2 (del inglés, tumor suppressor complex)<sup>23</sup>. La fosforilación inhibitoria de TSC2 por ERK1/2 y Akt inhibe la actividad GAP (del inglés GTPase activating protein) de TSC1 sobre la GTPasa RHEB (del inglés, Ras homologue enriched in brain), un activador esencial de mTORC1, lo cual activa la cascada de señalización<sup>34</sup>. Paralelamente la fosforilación estimuladora de TSC2 por AMPK, incrementa la actividad GAP del complejo TSC1/2 sobre RHEB, inhibiendo al complejo mTORC1<sup>22</sup>. Adicionalmente, AMPK puede inhibir directamente al complejo por medio de la fosforilación de Raptor<sup>39</sup>. Bajo condiciones hipóxicas, la reducción de los niveles de ATP, activan AMPK el cual a su vez promueve la activación de TSC1/2 inhibiendo a mTORC1<sup>40</sup>. La hipoxia también puede activar a TSC1/2 a través de una vía independiente de AMPK, que involucra a REDD1 (del inglés, Regulated in development and DNA damage response 1; también conocido como DDIT4), un producto proteico por medio del cual se suprime la actividad de mTORC1 (**Figura 4**).



**Figura 2**  
Complejo 1 de mTOR, proteínas asociadas, estímulos reguladores y blancos corriente abajo.

### FOSFORILACIÓN DE mTOR Y ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO mTORC1

La proteína mTOR presenta tres sitios de regulación mediada por fosforilación, a saber, Ser2481, Tre2446 y Ser2448. Estos residuos son parte del dominio catalítico de la proteína y la región que los incluye presenta una semejanza con los residuos del T-loop de activación de PDK1 y de otras AGC kinasas y se ha sugerido que Ser2481 podría ser blanco de los mismos reguladores corriente arriba de AGC<sup>24</sup>. El término AGC kinasa fue acuñado para definir el subgrupo de proteínas kinasas serinas/treoninas que incluyen proteína kinasa 1 dependiente de cAMP (PKA), proteína kinasa dependiente de cGMP (PKG) y proteína kinasa C (PKC)<sup>41</sup>. El residuo Tre2446 ha mostrado ser blanco de AMPK y de p70S6K y su fosforilación inhibe la actividad de mTORC1<sup>24</sup>. Dado que p70S6K también ha demostrado ser un blanco corriente abajo de mTOR se ha especulado que la fosforilación de este residuo forma parte de un mecanismo de retroalimentación negativa de mTOR<sup>23</sup>. Por último, la fosforilación del residuo Ser2448 ha mostrado ser blanco de Akt y de p70S6K, lo cual esto último formaría parte de un ciclo de retroalimentación positiva cuya función no es exactamente conocida<sup>42, 43, 44</sup>.

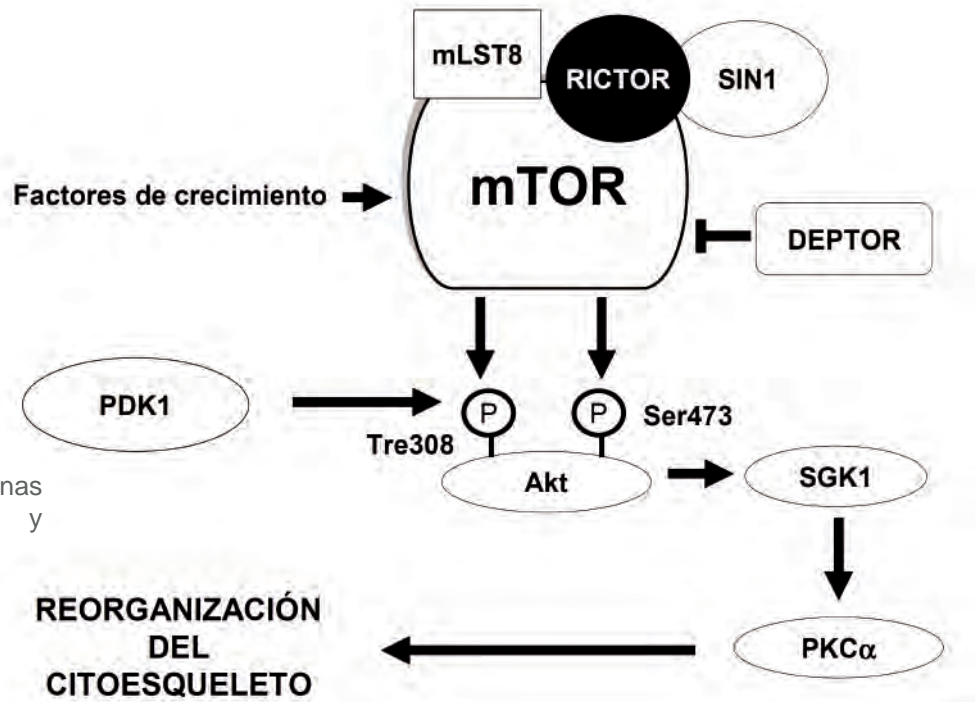
Una vez activado el complejo mTORC1, éste promueve la síntesis de proteínas por fosforilación de la proteína 1 de unión al factor de iniciación eucariótico 4E (4E-BP1) y p70S6K. La fosforilación de 4E-BP1 permite su separación de eIF4E (del inglés, eukariotic initiation factor 4E) estimulando la traducción del mRNA. En tanto, la activación de p70S6K conduce al aumento en la biogénesis ribosomal y en la traducción de mRNA dependiente de cap y de factores de elongación<sup>34, 45</sup>.

### FOSFORILACIÓN Y ACTIVACIÓN DE p70S6K POR mTORC1

p70S6K es una proteína serina/treonina kinasa de 70KDa también denominada proteína ribosomal S6 kinasa beta 1 (S6K-beta-1), S6K1 o kinasa alfa, pertenece a la familia AGC y cataliza la fosforilación de la proteína S6, un componente de la subunidad ribosomal 40S, fundamental para la traducción del mRNA preformado<sup>46</sup>. p70S6K está compuesta por 525 aminoácidos y actúa integrando las señales de nutrientes, factores de crecimiento y otros estímulos para la regulación de la síntesis de proteínas, proliferación y crecimiento celular así como la progresión del ciclo celular y la supervivencia<sup>47</sup>. p70S6K posee un dominio ácido, uno catalítico, uno regulatorio y uno autoinhibitorio (**Figura 5**). La función de p70S6K es dependiente de los dominios involucrados, en breve: 1) El dominio ácido que se extiende desde el N-terminal hasta el comienzo del dominio catalítico, posee una secuencia de cinco aminoácidos y facilita la asociación de p70S6K con RAPTOR permitiendo la eficiente fosforilación de éste. 2) El dominio catalítico incluye al residuo Tre229 y es blanco de fosforilación de PDK1. 3) El dominio regulatorio unido al terminal carboxilo incluye un residuo Tre389, es sensible a rapamicina y regulado por mTOR y 4) el dominio autoinhibitorio, que presenta al menos 4 sitios potencialmente fosforilables ubicados en el extremo carboxilo (Ser411, Ser418, Tre421 y Ser424) y es candidato para su fosforilación por MAP kinasa, ERK 1/2 y p38<sup>46</sup>.

La conformación activa de p70S6K es estabilizada por un mecanismo que involucra la fosforilación de su residuo Tre389, lo cual ha sido considerado un paso obligado para la posterior fosforilación de Tre229 por PDK1<sup>45</sup>. Por otro lado,





**Figura 3**

Complejo 2 de mTOR, proteínas asociadas, estímulos reguladores y blancos corriente abajo.

p70S6K puede ser defosforilada e inactivada por proteína fosfatasa 2A en los mismos residuos serina/treonina<sup>48</sup>. A pesar que es generalmente aceptado que p70S6K es un blanco corriente abajo de mTORC1, un estudio reciente en humanos ha mostrado que la fosforilación de mTOR en su residuo Ser2448 no siempre gatilla la activación de p70S6K por fosforilación de su residuo Tre389<sup>49</sup>, concordando con estudios previos en animales<sup>50, 51</sup>. Estos antecedentes indican que la activación de p70S6k por mTORC1 no es una constante para todos los estímulos y tejidos, pudiendo incluso la activación de mTOR por fosforilación de su residuo Ser2448, generar una regulación positiva, negativa o intrascendente<sup>37</sup>.

La complejidad en la activación de p70S6k está asociada con la cantidad de potenciales sitios de fosforilación (Tre229, Ser371, Tre389, Ser404, Ser411, Ser418, Tre421 y Ser424), no obstante, Tre389 y Tre229 parecen ser esenciales en la regulación de su actividad kinasa<sup>46</sup>.

### LA RUTA mTOR/p70S6K EN DIAFRAGMA

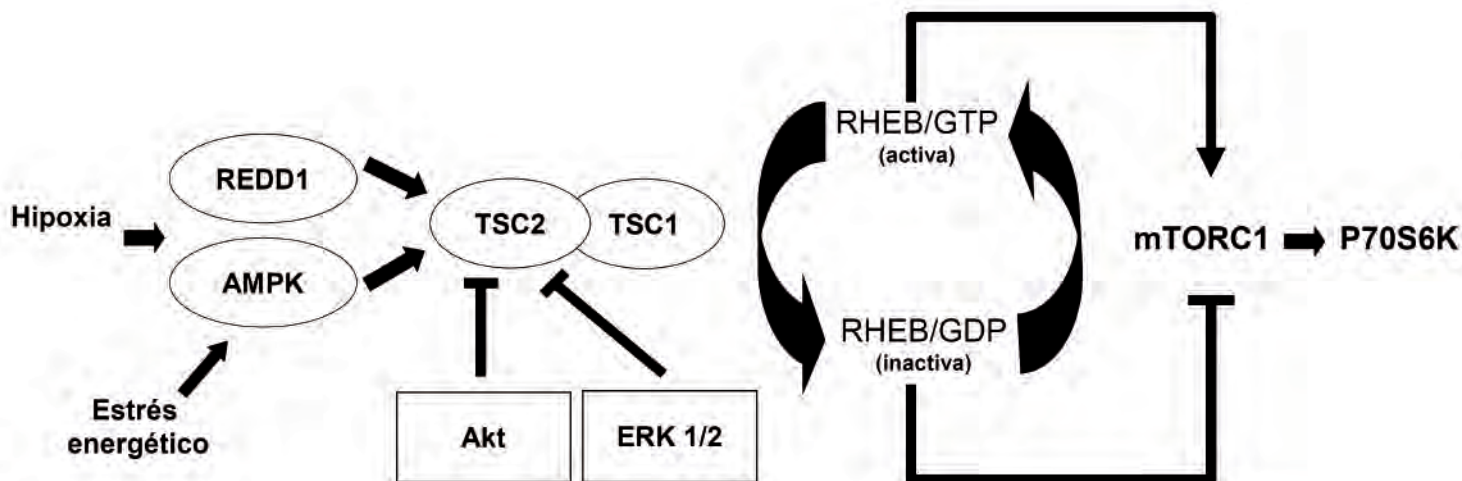
#### Similitudes y diferencias con músculos apendiculares

La participación de las proteínas mTOR y p70S6K en procesos de hipertrofia muscular asociada a sobrecarga han sido ampliamente documentados en musculatura esquelética apendicular<sup>5, 37, 42</sup>. Sin embargo, pocos antecedentes existen respecto de la participación de estas proteínas en la respuesta de la musculatura ventilatoria frente a

la descarga, la sobrecarga o factores nutricionales<sup>42, 43, 52, 53</sup>. La privación nutricional ha mostrado alterar significativamente las rutas de señalización involucradas en el recambio proteico. Lewis et al., (2006) han mostrado que una reducción del 20% de la ingesta habitual por cuatro días, reduce la fosforilación de Akt en Ser473, de mTOR en Ser2448, de p70S6K en Tre389, de ERK1 en Tre202 y ERK2 en Tir204, a la vez que aumenta la fosforilación de 4EBP1 en diafragma de ratas<sup>54</sup>.

Por su parte, el uso de ventilación mecánica ha mostrado inducir atrofia diafragmática, en un mecanismo asociado a incremento de la actividad de proteasas, del estrés oxidativo y de la actividad de FoXO<sup>19, 55</sup>. El mecanismo propuesto involucra la activación de calpaínas, lo cual incrementa la proteólisis y reduce la síntesis de proteínas musculares<sup>19</sup>, potencialmente a través de la reducción en la fosforilación de Akt y mTOR<sup>56</sup>.

En cuanto a la sobrecarga ventilatoria, estudios tempranos de Reid et al., (1992-1994) mostraron los cambios inducidos por la insuficiencia ventilatoria en el músculo diafragma y el daño muscular asociado<sup>11, 57</sup>. El modelo utilizado de sobrecarga obstructiva por banding traqueal, permitió evidenciar reducciones de la masa muscular, la contractilidad y la tolerancia a la fatiga diafragmática<sup>58</sup>. Los estudios a nivel molecular, sin embargo, son limitados y hasta el momento no se ha propuesto una relación entre la sobrecarga de la musculatura ventilatoria por obstrucción, con el comportamiento de la ruta mTOR-p70S6K, la cual es fundamental para mantener el equilibrio entre síntesis y degradación de proteínas y por tanto la funcionalidad de músculo.



**Figura 4**

El complejo TSC1/TSC2 integra diversos estímulos y modula la respuesta de mTOR a través de la GTPasa RHEB.

#### Activación de mTOR vía fosforilación en Ser2448

Diferentes estudios en músculos esqueléticos han señalado a mTOR como el punto de convergencia de las rutas de señalización responsables de la hipertrofia muscular por estímulo mecánico<sup>50</sup>. Sin embargo, la relación entre las características de la contracción muscular y la activación de la proteína no es un evento bien definido<sup>37</sup>.

Parkington et al., (2003) mostraron que la contracción muscular inducida por electroestimulación del nervio ciático, luego de un periodo de descarga generada por Hindlimb, provocaba un aumento en la fosforilación de mTOR en su residuo Ser2448, tanto en el músculo Tibial Anterior como en el Plantar (principalmente constituidos de fibras tipo II), pero no en el músculo sóleo (principalmente constituido de fibras tipo I) indicando que la activación de mTOR era dependiente del tipo de fibra muscular<sup>59</sup>. Terzis et al., (2008), por su parte, con una serie única de ejercicios en humanos mostraron un incremento en la fosforilación del residuo de Ser2448 de mTOR en Vasto Lateral<sup>43</sup> y Wilkinson et al. (2008), demostraron que tanto los ejercicios de fuerza como de resistencia provocaban el mismo efecto<sup>60</sup>. Estos resultados contrastan con los de Eliasson et al., (2006), quienes no observaron cambios en los niveles de fosforilación del residuo Ser2448 de mTOR en Vasto Lateral luego de una serie de ejercicios de resistencia máxima<sup>61</sup>. De esta forma, si bien la actividad muscular ha sido asociada con activación de mTOR, los datos disponibles permiten sugerir que la respuesta de mTOR frente a la contracción puede ser modulada por factores como la tipología miofibrilar como por la intensidad del ejercicio.

En músculo diafragma no existen, en nuestro conocimiento, estudios que analicen la respuesta de mTOR frente a la sobrecarga, sin embargo, en oposición al ejercicio intenso, un estudio reciente evaluó la respuesta de esta proteína en condiciones de inactividad diafragmática inducida por ventilación mecánica, no encontrando modificaciones luego de uno o cinco días de intervención<sup>62</sup>.

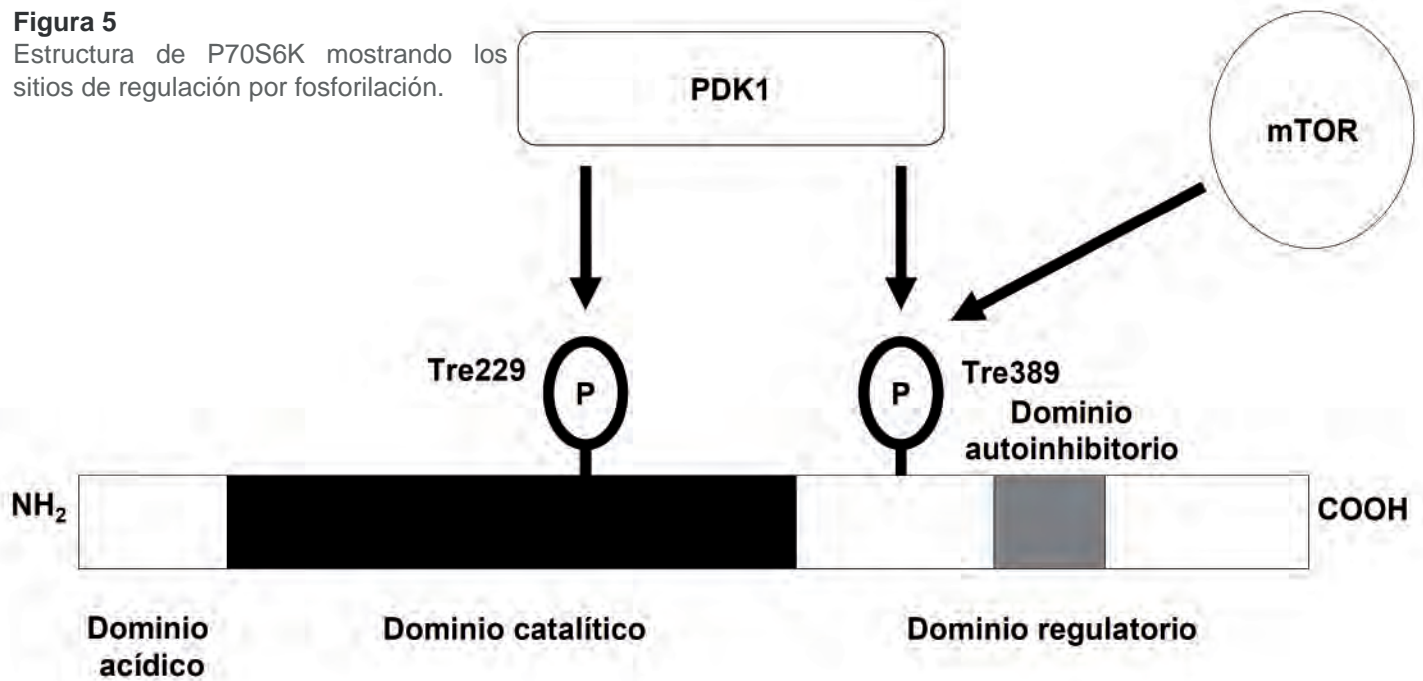
Datos preliminares de nuestro laboratorio indican que tanto la expresión de mTOR como su fosforilación en su residuo Ser2448, son incrementadas en el músculo diafragma luego de 7 días de sobrecarga ventilatoria por obstrucción mecánica de la vía aérea, lo que sugiere la activación de procesos de síntesis de proteínas en estas condiciones experimentales (datos no publicados).

#### Activación de p70S6K por fosforilación en Tre389, el rol de mTOR.

Es ampliamente aceptado que la activación de p70S6K se logra por varias rutas lo cual representa un paso importante para la síntesis de proteínas. En la mayoría de las condiciones de sobrecarga estudiadas en la musculatura esquelética, sin embargo, al igual que mTOR, su comportamiento parece también condicionarse por las características de la contracción muscular<sup>37</sup>. En este sentido Burry et al., (2007) mostraron, en músculo Tibial Anterior de rata, que una serie de contracciones en alargamiento generaba una mayor fosforilación del residuo de Tre389 de p70S6K cuando se comparaba con una serie de contracciones isométricas<sup>63</sup>. Respecto de la tipología miofibrilar, Parkington et al., (2003) han mostrado que en conjunto con la activación de mTOR,

**Figura 5**

Estructura de P70S6K mostrando los sitios de regulación por fosforilación.



la fosforilación del residuo Tre389 de p70S6K, es significativamente incrementada por la estimulación eléctrica en músculos rápidos (Tibial Anterior y Plantar) pero no en músculo lento (Sóleo)<sup>59</sup>. Eliasson et al., (2006) reportaron además una mayor fosforilación de Tre389 de p70S6K en contracciones excéntricas máximas versus contracciones concéntricas máximas o excéntricas submáximas, aún cuando la actividad de mTOR corriente arriba no fue modificada<sup>61</sup>. Por último, recientemente se ha mostrado que una serie de ejercicio físico de moderada intensidad (45 minutos al 75% del VO2MAX), no es suficiente para incrementar la fosforilación del residuo Tre389 de p70S6K en músculo Vasto Lateral de humanos, aún habiéndose observado una activación de mTOR<sup>49</sup>, resultados similares han sido reportados frente a ejercicios de fuerza y resistencia<sup>60</sup>.

#### Efecto de la fosforilación de mTOR en Ser2448 sobre la fosforilación de p70S6K en Tre389

La mayoría de los estudios con sobrecarga de músculo esquelético, muestran una relación directa entre la activación de mTOR y la activación de p70S6K<sup>5, 21, 23, 31, 44, 64</sup>. En musculatura diafragmática un solo estudio ha evaluado ambas proteínas, mostrando ausencia de esta relación directa en condiciones de inactividad<sup>62</sup> y ningún estudio ha utilizado la sobrecarga obstructiva de la vía aérea para evaluar previamente esta relación.

Frente a este vacío de conocimiento y ante la importancia de conocer la respuesta diafragmática al ejercicio intenso, es necesario intensificar esta área de estudio de tal forma de caracterizar los procesos biológicos que subyacen a los cambios morfológicos y funcionales observados en el

diafragma expuesto a estrés mecánico. En conclusión, el ejercicio intenso ha mostrado activar la síntesis de proteínas en el músculo a través de la ruta mTOR/p70S6K, sin embargo, los estudios que analizan esta vía de señalización molecular en diafragma son escasos. La expresión y activación de estas proteínas, frente a la sobrecarga, responden de una manera que parece ser dependiente del músculo estudiado y de las características de la contracción, por lo que los cambios observados en la musculatura apendicular no necesariamente serán encontrados en la musculatura ventilatoria. Lo cual hace imperioso desarrollar un modelo de estudio que permita comprender mejor la respuesta biológica del diafragma frente al ejercicio intenso.

#### AGRADECIMIENTOS

M. Escobar fue estudiante del Programa de Magíster en Kinesiología de la Universidad Católica del Maule y recibió apoyo de la Dirección de Investigación y Perfeccionamiento DINPER-UCM.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rennie M.J., Henning W., Spangenburg E., Booth F. (2004). Control of the Size of the Human Muscle Mass. *Annu Rev Physiol.* (66):799-828.
2. Glass D.J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell B.* (37):1974-1984.
3. Burkholder T.J. (2007). Mechanotransduction in skeletal muscle. *Front Biosci.* (12):174-191.
4. Wu M., Fannin J., Rice K., Wang B., Blough E. (2011). Effect of aging on cellular mechanotransduction. *Ageing Res Rev.* (10):1-15.
5. Glass D.J. (2003). Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med.* 9(8):344-350.
6. Cassano M., Quattrocchi M., Crippa S., Perini I., Ronzoni F., Sampaolesi M. (2009). Cellular mechanism and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. *J Muscle Res Cell Motil.* (30):243-253.
7. Friden J. & Lieber R. (1991). Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sport Exer.* 24(5):521-530.
8. Friden J. & Lieber R. (2001). Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol Scand.* (171):321-326.
9. Sherell K.B. (1991). Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sport Exer.* 24(5):531-536.
10. Allen D., Whitehead N., Yeung E. (2005). Mechanism of stretch-induced muscle damage in normal and dystrophic muscle: role of ionic changes. *J Physiol.* (567):723-735.
11. Reid W.D. & Belcastro A. (2000). Time course of diaphragm injury and calpain activity during resistive loading. *Am J Respir Crit Care Med.* (162):1801-1806.
12. Favier F., Benoit H., Freyssenet D. (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Eur J Physiol.* (456):587-600.
13. Reid W.D., Huang J., Bryson S., Walker D.C. and Belcastro A. (1994). Diaphragm injury and myofibrillar structure induced by resistive loading. *J Appl Physiol.* (76):176-184.
14. Mathur S., Sheel W., Road J.D., Reid W.D. (2010). Delayed Onset Muscle Soreness After Inspiratory Threshold Loading in Healthy Adults. *Cardiopulm Phy Ther J.* 21(1):5-12.
15. Jarvinen T.A., Jarvinen T.L., Kaariainen M., Kalimo H. and Jarvinen M. (2005). Muscles Injuries Biology and Treatment. *Am J Sports Med.* 33(5):745-764.
16. Ciciliot S. & Schiaffino S. (2010). Regeneration of Mammalian Skeletal Muscle: Basic Mechanism and Clinical Implications. *Curt Pharm Design.* (16):906-914.
17. Malm C. (2001). Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiol Scand.* (171):233-239.
18. Tanaka S., Miyata T., Fujita T., Kawahara E., Tachino K., Funakoshi H., Nakamura T. (2009). Differing Response of Satellite Cell Activity to Exercise Training in Rat Skeletal Muscle. *J Phys Ther Sci.* (21):141-145.
19. Shanely R., Zergeroglu M., Lennon S., Sugiura T., Yimlamai T., Enns D., et al. (2002). Mechanical Ventilation-induced Diaphragmatic Atrophy Is Associated with Oxidative Injury and Increased Proteolytic Activity. *Am J Respir Crit Care Med* (166):1369-1374.
20. Rabuel C., Samuel J., Lortat-Jacob B., Marotte F., Lanone S., Keyser C., et al. (2010). Activation of the ubiquitin proteolytic pathway in human septic heart and diaphragm. *Cardiovasc Pathol.* (19):158-164.
21. Laplante M. & Sabatini D. (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* (122):3589-3594.
22. Easton J. & Houghton P. (2005). The mTOR pathway and Its Inhibitors. Cap 36. *Cancer Drug Discovery and Development: The Oncogenomics Handbook.* Edited by W.J. LaRochelle and R.A. Shimkets. Humana Press Inc., Totowa NJ.
23. Foster K.G. &ingar DC. (2010). Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the Cellular Signaling Symphony. *J Biol Chem.* 285(19):14071-14077.
24. Jacinto E. (2008). What controls TOR?. *IUBMB Life* (60):483-496.
25. Wang L., Lawrence J., Sturgill T., Harris T. (2009). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity associated with phosphorylation of raptor by mTOR. *J Biol Chem.* 284(22):14693-14697.
26. Wang L., Harris T., Roth R., Lawrence J. (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem.* 282(27):20036-20044.
27. Peterson RT., Laplante M., Thoreen C., Sancack Y., Kang S., Kuehl W. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell.* (137):873-886.
28. Rosner M., Siegel N., Valli A., Fuchs C., Hengstschlager M. (2010). mTOR phosphorylated at S2448 binds to raptor and rictor. *Amino Acids* (38):223-228.
29. Facchinetti V., Ouyang W., Wei H., Soto N., Lazorchak A., Gould C., Lowry C., et al. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* (27):1932-1943.
30. Saini A., Faulkner S., Al-Shanti N., Stewart C. (2009). Powerful signals for weak muscles. *Ageing Res Rev.* (8):251-267.
31. Deldicque L., Theisen D., Francaux M. (2005). Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* (94):1-10.
32. Dreyer H., Drummond M., Pennings B., Fujita S., Glynn E., Chinkes D., et al. (2008). Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (294):E392-E400.
33. Drummond M., Dreyer H., Fry C., Glynn E., Rasmussen B. (2009). Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *J Appl Physiol.* (106):1374-1384.
34. Zoncu R., Efeyan A. and Sabatini D. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Mol Cell Biol* (12):21-35.
35. Porstmann T., Santos C., Griffiths B., Cully M., Wu M., Leever S., et al. (2008). SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. *Cell Metab.* 8(3):224-236.
36. Hornberger T.A. & Esser K.A. (2004). Mechanotransduction and the regulation of protein synthesis in skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* (63):331-335.
37. Zanchi N., & Herbert A. Jr. (2008). Mechanical stimuli of skeletal muscle: implications on mTOR/p70S6k and protein synthesis. *Eur J Appl Physiol.* (102):253-263.
38. Rivas DA, Lessard SJ, Coffey VG. (2009). mTOR function in skeletal muscle: a focal point for overnutrition and exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 34(5):807-16.
39. Gwin D., Shackelford D., Egan D., Mihaylova M., Mery A., Vasquez D., Turk B. and Shaw R. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol Cell.* (30):214-226.
40. Brugarolas J., Lei K., Hurley R., et al. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18:2893-2904.
41. Pearce L., Komander D. and Alessi D. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Mol Cell Biol.* (11):9-22.
42. Reynolds T., Bodine S., Lawrence J. (2002). Control of Ser 2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem.* 277(20):17657-17662.
43. Terzis G., Georgiadis G., Stratakos G., Vogiatzis I., Kavouras S., Manta P. (2008). Resistance exercises-induces in muscle mass correlates with p70S6k kinase phosphorylation in human subjects. *Eur J Appl Physiol.* 102:145-152.
44. Acosta-Jaquez H., Keller J., Foster K., Ekim B., Soliman G., Feener E., Ballif B.,ingar D. (2009). Site-Specific mTOR Phosphorylation Promotes mTORC1-Mediated Signaling and Cell Growth. *Mol Cell Biol.* 29 (15):4308-4324.
45. Ma X.M. & Blenis J. (2009). Molecular mechanism of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:307-318.
46. Pullen N., Dennis P.B., Andjelkovic M., Dufner A., Kozma S., Hemmings B. (1998). Phosphorylation and activation of p70S6K by PDK1. *Science.* 279(30):707-710.
- 47.ingar D. & Blenis J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* (23):3151-3171.
48. Bielinski V.A. & Mumby M.C. (2007). Functional analysis of the PP2A subfamily of protein phosphatases in regulating drosophila S6 kinase. *Exp Cell Res.* 313(14):3117-3126.



49. Mascher H., Andersson H., Nilsson P., Ekblom B., Blomstrand E. (2007). Changes in signaling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise. *Acta Physiol.* 191:67-75.
50. Bolster D., Kubica N., Crozier S., Williamson D., Farrell P., Kimball S., Jefferson L. (2003). Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signaling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 553(1):213-220.
51. Nader G. (2005). Molecular determinants of skeletal muscle mass: Getting the AKT together. *Int J Biomech Cell Biol.* (37):1985-1996.
52. Lang JM., Esser K.A., Dupont-Versteegden E. (2004). Altered activity of signaling pathways in diaphragm and tibialis anterior muscle of dystrophic mice. *Exp Biol Med* (229):503-511.
53. Ochi E., Hirose T., Hiranuma K., Min S.K., Ishii N., Nakazato K. (2010). Elevation of myostatin and FOXOs in prolonged muscular impairment induced by eccentric contractions in rat medial gastrocnemius muscle. *J Appl Physiol* (108):306-313.
54. Lewis M., Bodine S., Kamangar N., Xu X., Da X., Fournier M. (2006). Effect of severe short-term malnutrition on diaphragm muscle signal transduction pathways influencing protein turnover. *J Appl Physiol* (100):1799-1806.
55. Mc Clung J., Kavazis A., Widdhen M., DeRisseau K., Falk D., Criswell D., Powers S. (2007). Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB-Akt) signaling. *J Physiol.* 585(1):203-215.
56. Smith I. & Dodd S. (2007). Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signaling pathway in rat diaphragm muscle. *Exp Physiol.* 92(3):561-573.
57. Reid W.D., Noonan J., Chung F., Tesler-Mabe C. (1992). Ventilatory failure induced by tracheal banding in the hamster. *J Appl Physiol* (73):1671-1675.
58. Prezant D., Aldrich T., Richner B., Gentry E., Valentine D., Nagashima H., Cahill J. (1993). Effects of long-term continuous respiratory resistive loading on rat diaphragm function and structure. *J Appl Physiol.* 74(3):1212-1219.
59. Parkington J., Siebert A., LeBrasseur N., Fielding R. (2003). Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285:R1086-R1090.
60. Wilkinson S., Phillips S., Atherton P., Patel R., Yarasheski K., Tarnopolsky M. et al. (2008). Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J Physiol.* (586):3701-3717.
61. Eliasson J., Elfegoun., Nilsson J., Kohnke R., Ekblom B., Blomstrand E. (2006). Maximal lengthening contractions increase p70S6 kinase phosphorylation in human skeletal muscle in the absence of nutritional supply. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (291): E1197-E1205.
62. Argadine H., Mantilla C., Zhan W., Sieck G. (2011). Intracellular signaling pathways regulating net protein balance following diaphragm muscle denervation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300(2):C318-C327.
63. Burry M., Hawkins D., Spangenburg E. (2007). Lengthening contractions differentially affect p70S6k phosphorylation compared to isometric contractions in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* (100):409-415.
64. Parkington J., LeBrasseur N., Siebert A., Fieldeng. (2004). Contraction-mediated mTOR, p70S6K, and ERK 1/2 phosphorylation in aged skeletal muscle. *J Appl Physiol.* (97):243-248.

**Título abreviado:** Rol de MTOR/P70S6K en Diafragma

**A** Laboratorio de Biología Molecular y Kinesiogenómica, Departamento de Kinesiología, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile.

**B Correspondencia:**

Laboratorio de Biología Molecular y Kinesiogenómica, Departamento de Kinesiología, Universidad Católica del Maule, PO Box 617, Talca, Chile.  
E-mail:jmarquez@ucm.cl