

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención Morfofisiopatología y
Citodiagnóstico.**

**“Inmuno localización de NLRP3, TXNIP, IL-1 β y GSDMD de los músculos
esqueléticos rápidos, lentos y mixtos en roedores insulino resistentes”**

Martín Andre Maturana Rodríguez

Tutora: Dra. Paola Llanos

Co-tutora: Dra. Sonja Buvinic

16 de diciembre 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención Morfofisiopatología y Citodiagnóstico.

“Inmuno localización de NLRP3, TXNIP, IL-1 β y GSDMD de los músculos esqueléticos rápidos, lentos y mixtos en roedores insulino resistentes”

Martín Andre Maturana Rodríguez

Tutora: Dra. Paola Llanos

Co-tutora: Dra. Sonja Buvinic

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la de Paola Llanos, con un gran bucle inicial.

Paola Llanos
PhD. en Ciencias Biomédicas
Profesor Asistente
Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Santiago, 17 de enero 2023

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

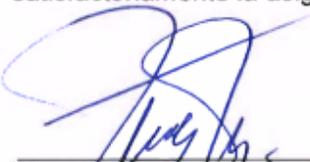
El **Sr. Martín Maturana Rodríguez**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfosiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el décimo semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **"Inmuno localización de NLRP3, TXNIP, IL-1 β y GSDMD de los músculos esqueléticos rápidos y lentos en roedores insulino resistentes"**, dirigida por la **Dra. Paola Llanos** y la **Dra. Sonja Buvinic**, ambas, académicas del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Dra. Gladys Tapia**, académico Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y la **Dra. Nevenka Juretic**, académica del Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

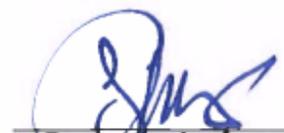
La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Gladys Tapia	6.91	25%
Corrector 2 Nevenka Juretic	6.83	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.94	

En consecuencia el estudiante **Martín Maturana Rodríguez** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Prof. Maroly Müller
Coordinadora curso
Trabajo de Investigación



Prof. Hernán Torres.
PEC curso
Trabajo de Investigación

A Moka & Minnie

“Yeah, science!”

Jesse Pinkman.

Agradezco profundamente a mis tutoras, la Dra. Paola Llanos por su implacable guía, buenos consejos y, por supuesto, su contagiosa motivación por la ciencia y el conocimiento que tanto la caracteriza. A la Dra. Sonja Buvinic por todo su apoyo y confianza al permitirme trabajar en su laboratorio.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Chyntia Cadagan, Javier Russell y Luan Américo Da-silva por su gran disposición, apoyo, guía y simpatía durante mi trabajo en el laboratorio. De igual manera agradezco a Rocío Carvajal por su amena compañía, paciencia y docencia.

Agradezco al Laboratorio de metabolismo muscular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile por la enriquecedora experiencia y la confianza brindada.

Agradezco a mis abuelitos por sus valiosas enseñanzas y por constantemente alimentar mi curiosidad a lo largo de mi vida.

Agradezco a mi familia y amigos por su preocupación, contención y apoyo.

Agradezco a Moka por su incondicional compañía y rebosante alegría.

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento del proyecto Fondecyt regular Nro 1190406.

ÍNDICES

RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	13
Obesidad, resistencia a insulina y musculo esquelético.....	14
Inflamación de bajo grado y su impacto sobre la señalización a la insulina	15
Inflamasoma NLRP3, el principal inflamasoma caracterizado en enfermedades crónicas.....	17
Gasdermina D y su función en la liberación IL-1 β	19
TXNIP: activación del inflamasoma NLRP3 mediada por ROS	19
Músculos rápidos, lentos y mixtos: metabólicamente diferentes	20
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
Hipótesis	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Modelo animal:	26
Medición de parámetros bioquímicos de los ratones:.....	26
Obtención de músculos rápidos, lentos y mixtos:.....	27
Obtención de cortes:.....	27
Protocolo de inmunofluorescencia:	27
Anticuerpos primarios:.....	28
Sistema de detección:	28
Obtención de imágenes:	29
Análisis de resultados:.....	29
RESULTADOS	30
Determinación de variables bioquímicas y morfométricas de ratones normales y alimentados con una dieta alta en grasas (HFD).	31
Localización subcelular de NLRP3 en fibras de músculos rápidos, lentos y mixtos.	33
Evaluación de la co-localización de TXNIP con NLRP3 en fibras de musculares.	33
Localización sarcolemal y sarcoplasmática de GSDMD en los distintos tipos de músculos.....	35
Evaluación de la distribución subcelular de IL-1 β en los distintos músculos estudiados.....	35
NLRP3 presenta mayor localización en las fibras de tipo II.....	36

DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIÓN	47
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXO	57

ABREVIATURAS

IRS: Sustrato del receptor de insulina.

FDB: Flexor digitor brevis.

GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4.

GSDMD: Gasdermina D.

HFD: Dieta alta en grasas, del inglés, High fat diet.

IL-1 β : Interleuquina 1 β .

JNK: c-Jun N-terminal quinasa.

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

NCD: Dieta control, del inglés, Normal control diet.

NF- κ B: Complejo enzimático inhibidor del factor nuclear- κ B.

NLRP3: Del inglés, Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family (NOD-like) pyrin domain containing 3.

PI-3K: Fosfoinositol-3 quinasa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno, del inglés, reactive oxygen species.

TLRs: Receptores tipo Toll.

TXNIP: Proteína que interacciona con Tiorredoxina, del inglés, Thioredoxin-interacting protein.

TRX: Tiorredoxina.

RESUMEN

INTRODUCCION. Estudios recientes han sugerido un papel central del complejo proteico NLRP3 en el desarrollo de la inflamación relacionada a la obesidad, caracterizado como un nexo metabólico entre metabolismo e inflamación. Se ha descrito que esta inflamación se asocia directamente a la activación de Interleuquina (IL)-1 β por parte del inflamasoma NLRP3, la cual es liberada desde la célula a través de poros conformados por la proteína Gasdermina D (GSDMD). A su vez, la actividad del inflamasoma NLRP3 se ve modulada por la proteína TXNIP (del inglés, Thioredoxin-interacting protein) que ha sido sugerida ser regulada por especies reactivas del oxígeno, éstas últimas, descritas ampliamente durante estadios de resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2. La regulación del inflamasoma NLRP3 ha sido caracterizada en diferentes células; sin embargo, escasamente explorada en el musculo esquelético y como su localización se asocia con las características fenotípicas y metabólicas de diferentes músculos (rápidos, lentos y mixtos) durante resistencia a la insulina. **OBJETIVO.** Por lo tanto, el objetivo fue evaluar la inmunolocalización de NLRP3, además de IL-1 β , TXNIP y GSDMD en músculos rápidos, lentos y mixtos aislados desde ratones insulino resistentes y controles. **METODOLOGIA.** Los músculos FDB, gastrocnemio, soleo y masetero fueron obtenidos desde ratones C57BL/6J luego de 8 semanas de dieta control (NCD) y alta en grasas (HFD). Se realizó inmunofluorescencia para las proteínas NLRP3, GSDMD, TXNIP e IL-1 β en cortes transversales de músculos y fueron visualizadas por microscopia de EPI fluorescencia. Para evaluar el tipaje de fibras, se llevó a cabo inmunofluorescencia contra la cadena pesada de miosina tipo I (BAD5) y tipo II (SC71). Los parámetros bioquímicos y morfométricos de los animales fueron medidos con técnicas convencionales. **RESULTADOS.** NLRP3, GSDMD e IL-1 β presentan una mayor distribución en músculos rápidos y lentos de ratones con HFD. Sin embargo, en relación con TXNIP no se obtuvieron resultados concluyentes respecto a su distribución. Una mayor distribución de NLRP3 fue observada en fibras tipo II. **CONCLUSION Y PERSPECTIVAS.** Todas las proteínas estudiadas se encuentran presentes en los músculos rápidos, lentos y mixtos. NLRP3 colocaliza con TXNIP y se encuentra principalmente en fibras tipo II. Futuros estudios son necesarios para describir con mayor profundidad la expresión, distribución y

actividad del complejo inflammasoma NLRP3 y de las proteínas que modulan su activación junto con la liberación de IL-1 β . La evidencia presentada podría ayudarnos a definir si la localización del complejo inflammasoma NLRP3 es relevante para la comprensión de la resistencia a la insulina muscular y su impacto como potencial blanco en alteraciones metabólicas.

Palabras clave: Músculo esquelético; Resistencia a la insulina; Inflammasoma NLRP3, GasderminaD, TXNIP, Músculos rápidos y lentos.

INTRODUCCIÓN

Obesidad, resistencia a insulina y musculo esquelético

En el año 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que 1,9 billones de personas padecían de sobrepeso y 650 millones eran obesas; además, proyectó que para 2040 cerca de 642 millones de personas padecerán diabetes tipo 2 ^[1]. Estas condiciones se correlacionan directamente con el sobreconsumo de comida alta en calorías, con alto niveles de azúcar refinada y se han relacionado a un estado de inflamación crónica de bajo grado, también denominada inflamación metabólica ^[2]. Un hallazgo característico del sobrepeso y la obesidad es el desarrollo de resistencia a la insulina en el tejido adiposo, el hígado y en el músculo esquelético, siendo la resistencia a la insulina del músculo esquelético la principal característica de la diabetes de tipo 2 ^[3]. La resistencia a la insulina se define como el estado en el que los tejidos producen una respuesta disminuida para la captación de glucosa mediada por insulina frente a niveles normales o elevados de insulina ^[2].

En los humanos, el músculo esquelético es el sitio principal donde ocurre captación de glucosa inducida por insulina en el estado postprandial. Alrededor del 80% de la captación de glucosa ocurre en este tejido ^[3]. La insulina promueve la captación de glucosa en las fibras musculares por la activación de una compleja cascada de fosforilaciones/desfosforilaciones ^[2]. En el músculo esquelético la insulina se une a su receptor, produciendo la autofosforilación cruzada de residuos clave de tirosina de las subunidades beta ^[4]. El receptor de insulina fosforilado reconoce y fosforila al sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), IRS-1 al ser fosforilado se une y activa a la subunidad regulatoria p85 de la fosfoinositol-3 quinasa (PI-3K) y la activación de subunidad catalítica p110, la cual promueve un incremento en fosfoinositol-3,4,5 trifosfato. La activación de PI-3K resulta en la activación de la proteína Akt y la fosforilación del sustrato 160 de Akt (AS160), este facilita la traslocación de vesículas que contienen al transportador de glucosa tipo 4 (GLUT 4) desde el citoplasma a la red de túbulos transversales y la membrana sarcolemal permitiendo la captación de glucosa ^[5]. En las fibras del músculo esquelético los túbulos T comprenden la mayor superficie de la membrana y son el principal sitio donde ocurre la mayor señalización de insulina, traslocación de

GLUT 4 y captación de glucosa ^[2]. En estados de resistencia a la insulina tanto la translocación inducida por insulina como la captación de glucosa se ven dramáticamente reducidas ^[6,7].

Inflamación de bajo grado y su impacto sobre la señalización a la insulina

La obesidad es usualmente asociada a inflamación crónica de bajo grado, la cual se encuentra involucrada en la patogénesis de la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, aterosclerosis y esteatosis hepática, entre otros ^[2]. La expresión de diferentes citoquinas proinflamatorias se ha encontrado elevada en el tejido adiposo, hígado y músculo esquelético de modelos animales y pacientes humanos obesos e insulino resistentes ^[8]. Estudios recientes han sugerido un rol especial de las fibras musculares en el desarrollo de la inflamación relacionada a la obesidad. Recientemente, se ha demostrado que fibras musculares esqueléticas aisladas son capaces de secretar marcadores inflamatorios en roedores con obesidad inducida por dieta, culminando en una resistencia a la insulina muscular ^[9]. La activación de la señalización inflamatoria intracelular en individuos obesos está relacionada a estímulos como altos niveles de ácidos grasos circulantes y citoquinas proinflamatorias ^[8]. La activación del complejo enzimático inhibidor del factor nuclear- κ B (NF- κ B) quinasa (IKK) produce la fosforilación del inhibidor del NF- κ B (I κ B α) y su subsecuente degradación a través del proteosoma ^[8]. Esto causa la traslocación de NF- κ B al núcleo y promueve la expresión génica de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y factores de adhesión, entre otros ^[8]. La activación de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) e IKK, ambas serinas/treoninaquinasas, interrumpen la señalización de insulina y promueven la resistencia a la insulina a través de fosforilación de IRS-1 e IRS-2, en residuos de serina, causando su inactivación ^[10]. La fosforilación inhibitoria de JNK a IRS1/2 lleva a un reclutamiento reducido de la PI-3K/Akt en la cascada de señalización en respuesta a la insulina ^[11]. La inhibición de la vía de PI-3K/Akt bloquea casi toda la acción metabólica de la insulina, incluyendo la estimulación del transporte de glucosa, síntesis de glicógeno y síntesis de lípidos ^[12] (Fig. 1).

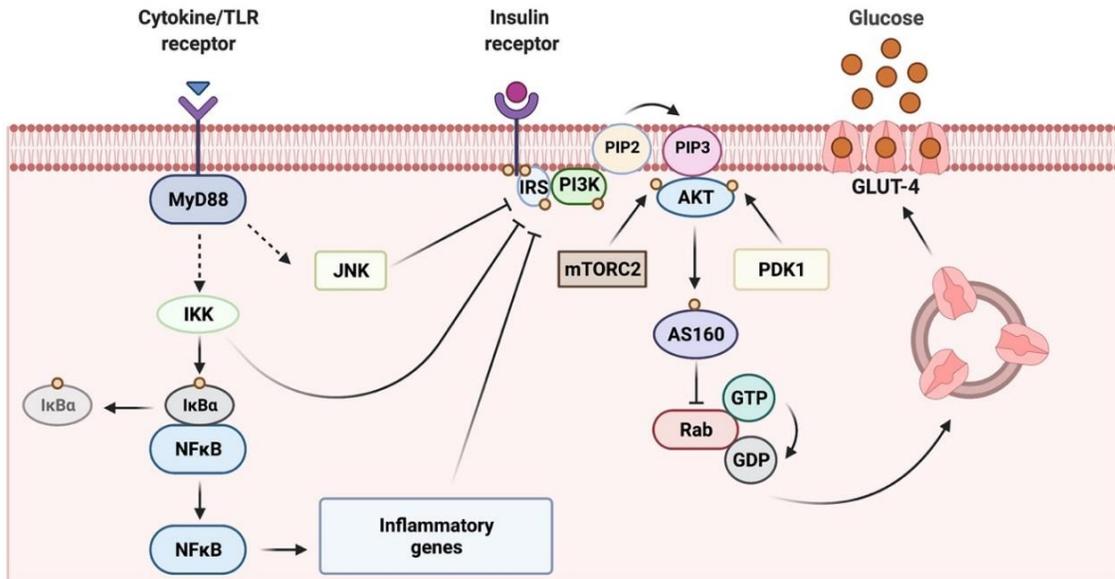


Figura 1. Señalización cruzada entre vía inflamatoria y vía de captación de glucosa mediada por insulina. Los receptores de citoquinas y *Toll-like* al ser activados reclutan al adaptador *MyD88* (Izquierda). *MyD88* activado conduce a la activación del complejo enzimático inhibidor del factor nuclear- κ B (NF- κ B) quinasa (IKK), el cual a su vez produce la fosforilación del inhibidor del factor nuclear- κ B ($I\kappa B\alpha$) resultando en la degradación de $I\kappa B\alpha$ dependiente de ubiquitina. NF- κ B es traslocado al núcleo e inicia la transcripción de los genes proinflamatorios. Además, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) es activada mediante esta vía. JNK, IKK y las citoquinas inflamatorias promueven la fosforilación inhibitoria en IRS (en residuos de serina), impactando en el transporte de glucosa mediado por insulina (derecha)^[2]

Inflamasoma NLRP3, el principal inflamasoma caracterizado en enfermedades crónicas

Estudios recientes han demostrado que esta inflamación asociada a la obesidad también ocurre en los músculos esqueléticos^[9,13-15]. Sin embargo, su causa y su papel en la resistencia a la insulina y desarrollo de diabetes tipo 2 no se ha dilucidado del todo. De acuerdo con la siguiente evidencia se ha apoyado la relevancia de la inflamación en el músculo esquelético:

- Una serie de hallazgos experimentales y clínicos demostraron que el músculo esquelético actúa como un órgano secretor^[16].
- En condiciones fisiológicas, las fibras musculares producen y secretan citoquinas y otros péptidos, clasificados como mioquinas, las cuales podrían ejercer un efecto paracrino, endocrino o autocrino^[16,17].
- La lista de mioquinas está en crecimiento e incluye interleuquinas como IL-1, IL-1R α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)^[8,16,18,19].

Además, el músculo esquelético expresa varios componentes del sistema inmune innato, incluyendo receptores de citoquinas biológicamente activos y receptores tipo Toll (TLRs)^[20]. Existe evidencia también respecto a que los ácidos grasos libres saturados pueden activar una respuesta inflamatoria de los músculos, posiblemente a través de los receptores TLR^[21]. Por ejemplo, la administración parenteral de ácidos grasos libres a ratones por 2 horas induce fosforilación de JNK y resistencia a la insulina en músculo e hígado^[21]. En el caso de los receptores de citoquinas, se ha propuesto que una dieta alta en grasas estimula el receptor de IL-1, mediando una cascada de señalización con la activación de NF- κ B en el músculo esquelético de ratones^[22].

Actualmente, la inflamación metabólica es un área de investigación muy activa. Desde el descubrimiento del inflamasoma NLRP3, se ha sugerido que este complejo proteico es un nexo molecular entre metabolismo e inflamación^[23]. El inflamasoma NLRP3 está formado por la

interacción de un núcleo de proteínas intracelulares identificadas como NLRP3 (del inglés: *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family (NOD-like) pyrin domain containing3*), la proteína ASC (una proteína *speck-like* asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa o CARD) y la proteína efectora pro-caspasa-1^[24] (ver Fig. 1).

El inflamasoma NLRP3 activado procesa la procaspasa-1 a su forma enzimática activada de caspasa-1 y libera citoquinas proinflamatorias maduras, tales como IL-1 β e IL-18^[25,26]. La maduración y liberación de IL-1 β e IL-18 requiere dos pasos. El primer paso, denominado *priming* el cual conduce a la expresión y síntesis de pro-IL-1 β y pro-IL-18 y otros componentes inflamatorios como la expresión de NLRP3^[27]. La señal de *priming* mediada por los TLRs es activado por componentes microbianos (denominados patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs) o por receptores de citoquinas activados por citoquinas endógenas, promueven la vía de NF- κ B para aumentar la expresión de los genes y con ello el nivel de estas proteínas, el cual, en condiciones normales es relativamente bajo^[27,28,29]. La activación de la señalización mediante TLR no solamente aumenta la expresión transcripcional de NLRP3, sino que también posttranscripcionalmente activa NLRP3 mediante fosforilación y de ubiquitinación^[30]. Por otro lado, el segundo paso para la activación del inflamasoma resulta en un ensamblaje del complejo inflamasoma NLRP3, con activación de la caspasa-1 y la subsecuente activación de la secreción de IL-1 β e IL-18 al medio extracelular^[25]. Una variedad de estímulos extracelulares incluyendo ATP extracelular, toxinas que forman poros, virus RNA y material particulado son necesarios para crear esta segunda señal de oligomerización. Además, eventos extracelulares o intracelulares como generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), flujo iónico o daño lisosomal, entre otras, han sido relacionados con la activación del inflamasoma NLRP3^[27,31,32].

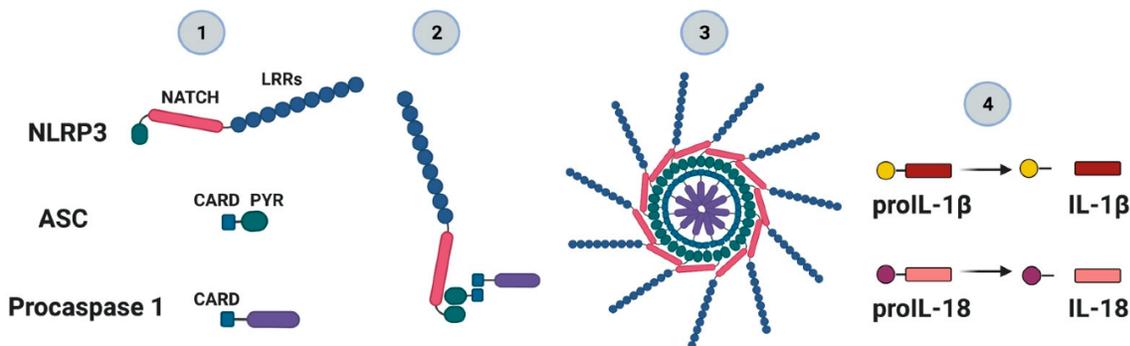


Figura 2. Componentes del complejo inflammasoma. (1) NLRP3, ASC y procaspasa 1; (2) Unión de los componentes; (3) Oligomerización del complejo inflammasoma NLRP3; (4) Procesamiento IL-1b e IL-18^[2].

Gasdermina D y su función en la liberación IL-1β.

La proteína IL-1β carece de un péptido de señalización requerido para su secreción a través la vía de secreción clásica ^[33], y se ha sugerido que es liberada al medio extracelular mediante mecanismos no convencionales, tales como una secreción mediada por Gasdermina D (GSDMD) ^[34]. GSDMD es una proteína citoplasmática de 55 kDa sobre la cual es propuesta, que luego de la activación proteolítica por la actividad de la caspasa-1, sus dominios N-terminales se insertan a sí mismos en la membrana plasmática, promoviendo la formación de poros oligoméricos, los cuales permiten la liberación de IL-1β al medio extracelular ^[35]. Sin embargo, el papel del inflammasoma NLRP3 en la liberación de IL-1β por los poros de GSDMD y su localización subcelular durante resistencia a la insulina inducida por obesidad en el tejido de músculo esquelético sigue no dilucidado.

TXNIP: activación del inflammasoma NLRP3 mediada por ROS

La obesidad ha sido asociada estrechamente con un aumento en la producción de ROS mediante actividad de NADPH oxidasa y disfunción mitocondrial ^[36-38]. En paralelo, se ha descrito que una

producción aumentada de ROS funciona como un mecanismo esencial para la activación del inflammasoma NLRP3^[39]. La proteína TXNIP se ha sugerido como el nexo que conecta la producción de ROS y la activación del inflammasoma NLRP3^[40]. TXNIP modula la actividad del sistema redox de la tiorredoxina (TRX), afectando al estado redox de la célula. Sin embargo, la producción de ROS induce la disociación entre TXNIP/TRX, mientras conduce a una interacción entre TXNIP/NLRP3^[40]. Distintos estudios han sugerido que TXNIP es requerido para la activación inducida por ROS del inflammasoma NLRP3^[41,42]. Interesantemente, la expresión de TXNIP en el músculo esquelético es modulada por insulina, por lo que se sugeriría que en un contexto de resistencia a la insulina se podría evidenciar una alteración en la modulación de la expresión de TXNIP^[43]. Sin embargo, el mecanismo molecular preciso mediante el cual TXNIP induce la oligomerización de NLRP3/ASC/pro-caspasa-1 y la activación del inflammasoma NLRP3 en el músculo esquelético no ha sido determinada aún.

En síntesis, varios estudios recientes han apoyado a la conclusión respecto a que la activación de este inflammasoma está relacionada a un incremento de la IL-1 β circulante y asociada a los músculos esqueléticos durante la resistencia a la insulina, reduciendo de forma crítica la traslocación de GLUT4 inducida por insulina^[44,45].

Músculos rápidos, lentos y mixtos: metabólicamente diferentes

Por un lado, tenemos las fibras musculares lentas o de tipo I, estas fibras son capaces de generar todo el ATP que necesitan mediante procesos mitocondriales oxidativos (metabolismo oxidativo), durante la contracción muscular, estas fibras no consumen gran cantidad de ATP, esto contribuye a la capacidad de este tipo de fibras para mantener una actividad contráctil por largo tiempo sin caer en fatiga^[46].

Por otro lado, las fibras musculares rápidas o tipo II basan su metabolismo en procesos glicolíticos para generar ATP de manera muy rápida, poniendo a su vez un límite de duración para su actividad contráctil^[46]. En el presente estudio trabajamos con músculos lentos (soleo y masetero, compuestos principalmente por fibras musculares tipo I^[47]), rápidos (*flexor digitor brevis*, compuesto principalmente por fibras musculares tipo IIa y IIx^[47]) y mixtos (gastrocnemio, compuesto tanto por

fibras tipo I y tipo II). Previamente se ha descrito que las fibras musculares lentas (tipo I), con un metabolismo oxidativo lento, son más activas en la captación de la glucosa que las fibras musculares rápidas, con un metabolismo oxidativo – glucolítico rápido (tipo IIa) y un metabolismo glucolítico rápido (tipo IIx)^[46]. Por ello, alteraciones o cambios durante estados crónicos sistémicos como es la inflamación crónica de bajo grado, podría impactar diferencialmente sobre la alteración del funcionamiento de los músculos esqueléticos durante estadios metabólicos de homeostasis a la glucosa ^[46].

Hoy en día la obesidad es una enfermedad multifactorial que implica componentes genéticos, ambientales y propios del estilo de vida ^[45]. La OMS reportó que 650 millones de personas padecían de obesidad en el mundo (de los cuales, 462 millones padecen diabetes mellitus tipo 2^[48]), una cifra que ha aumentado en 3 veces desde 1975; proyectando un mayor crecimiento en las próximas décadas ^[49]. En Chile esta tendencia no es diferente, en el año 2019 según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, el 28,8% de la población chilena adulta es obesa ^[50]; considerando a la obesidad como un problema de salud pública de gran magnitud en todas las edades. Por otro lado, la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad actúa como un sustrato para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles de alta prevalencia ^[38]. Además, incrementa la severidad y letalidad de la diabetes tipo 2 o de otras afecciones microbianas como por ejemplo el mismo COVID-19. Desde una perspectiva económica debemos tener en consideración los elevados costos asociados al tratamiento de estas enfermedades en el sistema de salud nacional.

Considerando el contexto mundial actual y el consecuente desarrollo de resistencia a la insulina en condición de obesidad, se torna imperativo investigar más allá respecto a cómo es posible aportar en la solución de estas alteraciones metabólicas, considerando al inflamasoma NLRP3 un potencial blanco de estudio para dar respuesta a estas alteraciones. Si bien se han establecido algunas conclusiones al respecto, en la actualidad no se ha descrito acerca de las potenciales diferencias en los niveles

proteicos o localización de los componentes del inflamasoma NLRP3 de acuerdo con las características fenotípicas y metabólicas de diferentes músculos ^[41]. Por ello, nuestro objetivo estará centrado en evaluar la localización del complejo inflamasoma en diferentes músculos a través de inmunolocalización de las subunidades del complejo y su visualización por microscopia confocal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Durante la insulino resistencia inducida por la obesidad existe mayor inmunolocalización de las proteínas NLRP3, IL-1 β , TXNIP y GSDMD en músculos rápidos, lentos y mixtos de ratón comparado a los ratones insulino sensibles.

Objetivo general

Evaluar la inmunolocalización de NLRP3, además de IL-1 β , TXNIP y GSDMD en músculos rápidos, lentos y mixtos aislados desde ratones insulino resistentes y controles.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la condición de obesidad e insulino resistencia mediante evaluación de los parámetros bioquímicos (test de tolerancia a la glucosa e IL-1 β plasmática) y morfométricos (peso corporal) de los animales obesos y controles.
2. Comparar la localización subcelular de NLRP3 en musculos rápidos, lentos y mixtos de ratones controles e insulino resistentes inducidos por obesidad.
3. Comparar la localización subcelular de GSDMD, TXNIP e IL-1 β en músculos rápidos, lentos y mixtos de ratones controles e insulino resistentes inducidos por obesidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal:

Se utilizaron ratones macho C57BL/6J obtenidos de las instalaciones de la Universidad de Chile. Los ratones fueron mantenidos en un ambiente controlado a una temperatura constante de 21°C y con un ciclo de luz/oscuridad en una razón de 12:12. Luego de 21 días, los ratones fueron divididos en dos grupos:

- El grupo control con dieta normal (NCD) se alimentó con una dieta compuesta por 10% de grasas, 20% de proteínas y 70% de carbohidratos. (Research Diets D12450K)
- El grupo con una dieta alta en grasas (HFD) se alimentó con una dieta compuesta por 60% de grasas, 20% de proteínas y 20% de carbohidratos. (Research Diets D12492)

Los animales fueron sacrificados después de 8 semanas de dieta. Los procedimientos estuvieron sujetos a la aprobación por parte del comité de bioética de la Facultad de Medicina (CBA 1065 FMUCH).

Medición de parámetros bioquímicos de los ratones:

Los ratones fueron pesados y su peso corporal registrado. Posteriormente los ratones fueron puestos en ayuno por 6 horas y se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal; se administró glucosa en una cantidad tal de 2g/kg. Se tomó una muestra de sangre de la punta de la cola de cada ratón a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, luego se midió la glucosa sanguínea mediante el medidor de glucosa *One Touch II*.

Para la muestra de plasma se anestesió a los ratones y se obtuvieron muestras de sangre recolectadas en tubos mediante una punción cardíaca. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 5000 x g por 15 minutos a 4°C para separar la fracción plasmática. Finalmente, las muestras fueron alicuotadas e inmediatamente congeladas a -80 °C hasta ser procesadas de acuerdo con el protocolo del kit *Quantikine ELISA* para determinar la concentración de IL-1 β plasmática de los ratones.

Obtención de músculos rápidos, lentos y mixtos:

Se realizó el sacrificio de los animales a las 8 semanas de su tratamiento (dieta NCD o HFD) mediante dislocación cervical; de ellos se obtuvieron los músculos: gastrocnemio, masetero, sóleo y *flexor digitor brevis (FDB)* los cuales fueron congelados por 30-60 segundos con una capa fina de OCT en isopentano (-150°C) enfriado en nitrógeno líquido. Posteriormente los músculos fueron almacenados a -80°C hasta la obtención de cortes.

Obtención de cortes:

Los cortes fueron obtenidos usando un crióstato (Leica CMI520) a -20°C. Las muestras se llevaron desde su almacenamiento al crióstato donde fueron orientadas con OCT en el soporte de muestras. Se obtuvieron cortes transversales de 8 µm y fueron adheridos a portaobjetos cargados. Se realizó una tinción de hematoxilina eosina (ver anexo Fig. 1) por cada muestra para asegurar su integridad. Los cortes obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Protocolo de inmunofluorescencia:

Los cortes almacenados fueron secados a temperatura ambiente por 10 minutos y se ubicaron en una cámara húmeda. Luego se realizaron dos lavados suaves con 500 µL de PBS 1X (2 minutos cada uno). A continuación, se agregaron 500 µL de Glicina 100 Mm por 10 minutos seguido de dos lavados con 500 µL de PBS 1X (2 minutos cada uno). Posteriormente se permeabilizó con PBS 1X – Tritón X100 0,1% por 10 minutos, seguido de dos lavados con 500 µL de PBS 1X (2 minutos cada uno). Luego se bloqueó con 500 µL de PBS 1X – BSA 4%, (2 veces, 5 minutos cada vez). Finalmente se incubó con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1X – BSA 4% a temperatura ambiente y se incubó con los anticuerpos secundarios por 30 minutos a temperatura ambiente. (Previamente la dilución del anticuerpo secundario fue centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm y 4°C). Luego se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS 1X – BSA 4% a temperatura ambiente y

se continuo con una incubación con Hoechst (1:5000) en PBS 1X – BSA 2% a temperatura ambiente por 10 minutos. Para finalizar se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS 1X – BSA 4% a temperatura ambiente, se llevó a cabo el montaje utilizando el medio de montaje DAKO y las placas fueron dejadas a oscuras a temperatura ambiente durante toda la noche para su secado.

Anticuerpos primarios:

Clonalidad	Especie	Reactividad	Dilución	Marca
Monoclonal	Rata	NLRP3	1:100	R&B
Policlonal	Conejo	GSDMD	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Monoclonal	Conejo	TXNIP	1:200	Invitrogen
Policlonal	Ratón	IL-1 β	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal	Ratón	PIP2	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal	Conejo	Laminina	1:200	BIOSS
Policlonal	Ratón	Cadena pesada miosina tipo I	1:7	DSHB
Policlonal	Ratón	Cadena pesada miosina tipo II	1:6	DSHB

Sistema de detección:

Clonalidad	Especie hospedera	Reactividad	Conjugado	Dilución	Marca
Policlonal	Cabra	Rata	Alexa Fluor 488	1:200	Invitrogen
Policlonal	Cabra	Conejo	Alexa Fluor 555	1:200	Invitrogen
Policlonal	Burro	Ratón	Alexa Fluor 555	1:200	Invitrogen
Policlonal	Cabra	Conejo	Alexa Fluor 488	1:200	Invitrogen

Obtención de imágenes:

Las placas fueron observadas en un microscopio de EPI fluorescencia modelo “Nikon eclipse Ti” y mediante el software NIS – elements.

Análisis de resultados:

Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas en el *software* imageJ. Para la medición de parámetros bioquímicos y antropométricas se presentan los resultados como promedio \pm SEM. Para aquellos datos de distribución no normal se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para datos no pareados. Para la significancia estadística se consideró un $p < 0,05$. Para el análisis de los datos y la construcción de gráficos se utilizó el programa computacional GraphPad Prism 8 (GraphPad Programa Inc, San Diego, CA, EE. UU.).

RESULTADOS

Determinación de variables bioquímicas y morfométricas de ratones normales y alimentados con una dieta alta en grasas (HFD).

Para corroborar que los ratones sometidos a HFD durante 8 semanas desarrollaron resistencia a la insulina y obesidad, realizamos una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y medimos el peso corporal. Para evaluar un estado inflamatorio crónico, llevamos a cabo mediciones de la concentración plasmática de IL-1 β por ELISA. Como se muestra en la figura 3, un aumento significativo respecto al grupo control de la glicemia en ayuno fue encontrada en los ratones HFD (Fig. 3A). Tras un desafío de glucosa intraperitoneal, la curva de tolerancia a la glucosa en los animales HFD presentó valores de glicemia significativamente mayores en todos los puntos ensayados hasta los 120 min (Fig. 3A). De manera concordante, una mayor concentración de glucosa circulante por minuto fue encontrada tras la medición del área bajo la curva del test de tolerancia a la insulina (Fig. 3B). Los valores alcanzados del área bajo la curva fueron de $40145,8 \pm 1561$ y $28248,8 \pm 1052$ mg*min/dL para los ratones HFD y controles, respectivamente. Como era esperable, el peso corporal fue mayor en los animales HFD comparado con los controles ($44,08 \pm 1,520$ y $36,78 \pm 0,5417$ g, respectivamente) (Fig. 3C). La resistencia a la insulina ha sido relacionada con la inflamación crónica de bajo grado, por ello, nosotros medimos los niveles plasmáticos de IL-1 β (Fig. 3D). De interés, los animales HFD mostraron niveles de $8,287 \pm 0,6676$ ng/mL comparados con los animales controles, los cuales alcanzaron valores de $4,528 \pm 0,3104$ ng/mL. En conjunto, nuestros resultados muestran que, tras 8 semanas de dieta, el modelo de resistencia a la insulina es establecido y que los animales presentan una inflamación crónica comparados con los animales controles.

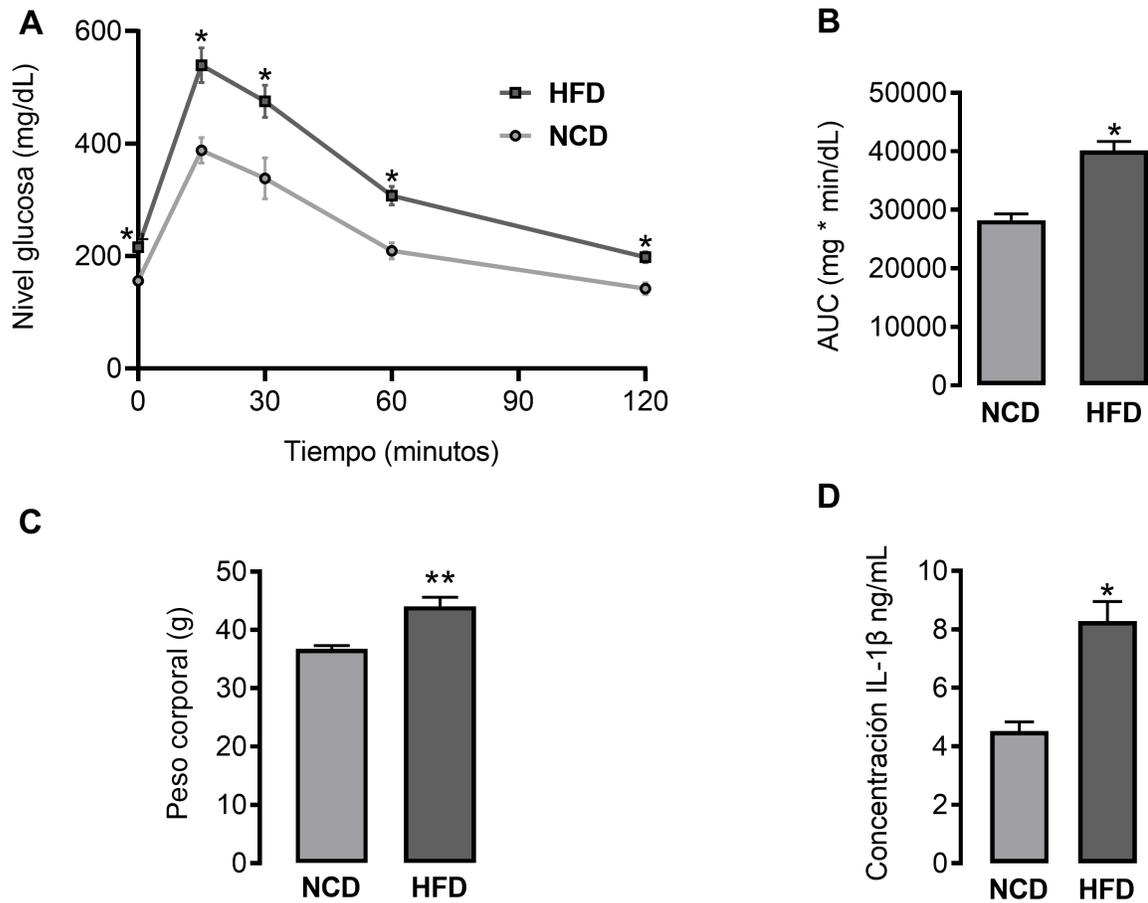


Figura 3: Caracterización de parámetros bioquímicos y morfométricos de los animales obesos (HFD) y controles (NCD). Se presenta la comparación de la curva resultante de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (A), el área bajo la curva de glucosa (B), los pesos corporales (C) y la concentración de IL-1 β plasmática (D) entre los ratones controles y obesos. Los datos se muestran como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para datos no pareados: * $p < 0.05$ (n=5), ** $p < 0.01$ (n=5). NCD, control normal diet; HFD, high-fat diet.

Localización subcelular de NLRP3 en fibras de músculos rápidos, lentos y mixtos. Con la finalidad de evaluar la localización de la proteína central del inflamasoma NLRP3, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia indirecta para esta proteína en los músculos FDB, gastrocnemio, masetero y soleo (Fig. 4). Un inmunomarcaje específico verde fue detectado en el sarcoplasma de las fibras musculares, presentando una mayor intensidad con patrón puntiforme en los cortes obtenidos desde los ratones HFD comparado con los controles. De interés, este aumento en la marcación fluorescente fue encontrada en todos los músculos ensayados. Una marca en mosaico heterogénea fue observada entre las células del tejido en los músculos estudiados. Esto último sugiere que posiblemente la abundancia proteica de NLRP3 sea diferencial según el tipaje de fibras musculares.

Evaluación de la co-localización de TXNIP con NLRP3 en fibras de musculares. Ha sido ampliamente descrito que TXNIP puede colocalizar con la proteína NLRP3 en condiciones oxidativas celulares. Como se muestra en la figura 4, FDB, gastrocnemio, masetero y soleo presentan un inmunomarcaje positivo para TXNIP, con una distribución mayormente sarcolemal y sarcoplasmática con un patrón granular. La intensidad del marcaje fue homogénea entre las células de los músculos estudiados. Respecto a la diferencia de intensidad entre las dos condiciones estudiadas, se observa que los músculos FDB y soleo existe un aumento de intensidad de fluorescencia en los cortes extraídos desde los animales HFD en comparación con NCD. De manera contraria, en el caso del músculo masetero se observa una mayor intensidad del marcaje en la condición de NCD en comparación con la HFD. En el músculo gastrocnemio no se percibe una variación de intensidad entre ambas condiciones. De forma interesante, en la condición HFD en los músculos FDB, gastrocnemio y soleo se observa en la sobreposición de ambas imágenes una colocalización periférica mayor comparada con la condición NCD.

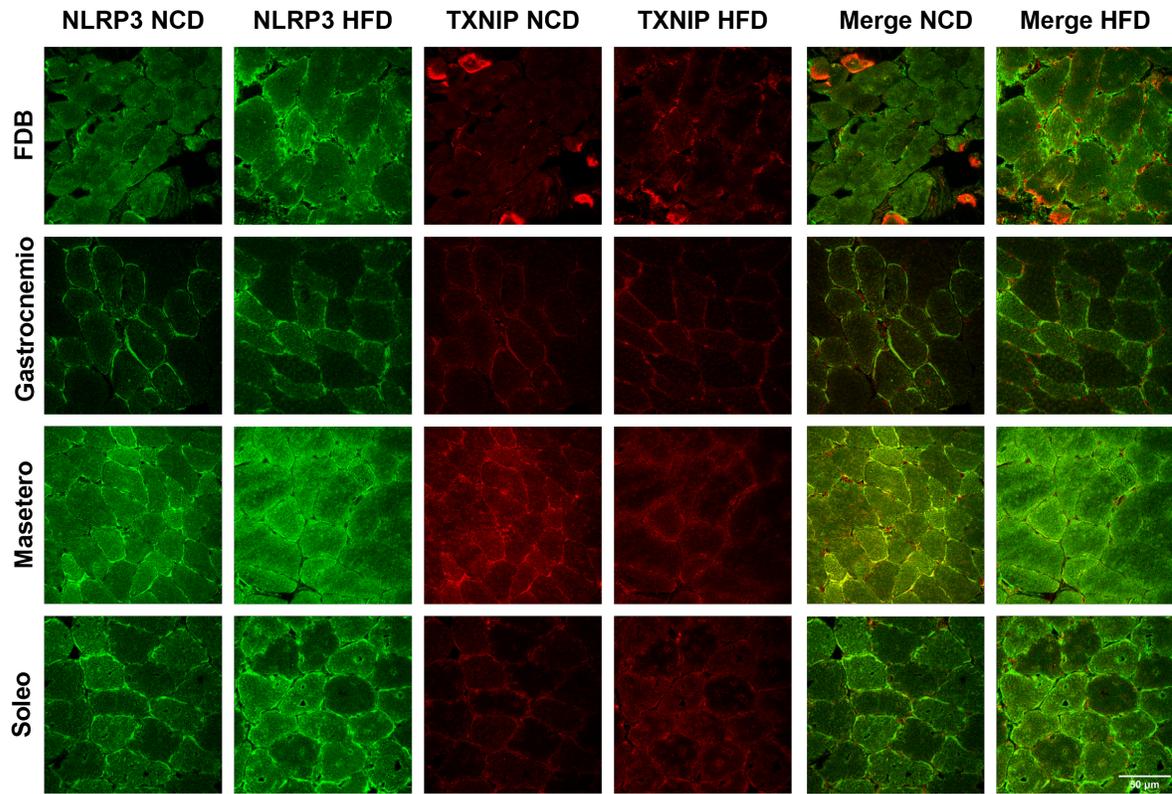


Figura 4: Co-localización de NLRP3 y TXNIP. Se observan imágenes representativas (40x) para el inmunomarcaje de NLRP3 (marcaje verde) y TXNIP (marcaje rojo) en FDB, gastrocnemio, masetero y soleo respectivamente de ratones controles (NCD) y obesos (HFD), ambos con una dieta de 8 semanas.

Localización sarcolemal y sarcoplasmática de GSDMD en los distintos tipos de músculos. Para evaluar la localización subcelular de GSDMD, inmunomarcaje en fluorescencia verde fue observado. En la condición NCD, tanto los músculos FDB, gastrocnemio, masetero y soleo presentan una marca fluorescente positiva con una distribución sarcolemal y sarcoplasmática con un patrón puntiforme (Fig. 5). Se observó una intensidad de fluorescencia verde en mosaico y heterogénea entre las distintas células de los músculos, especialmente en gastrocnemio. En la condición HFD, los músculos estudiados presentan un inmunomarcaje positivo con una distribución principalmente sarcolemal y con menor intensidad en el sarcoplasma, exhibe un patrón puntiforme. Respecto a la intensidad de fluorescencia comparada entre las dos condiciones estudiadas, se observa que en los músculos existe un aumento de la intensidad, con una distribución sarcolemal en la condición de HFD en comparación con NCD. Particularmente en el músculo FDB, el aumento de la intensidad de fluorescencia presenta un aspecto más homogéneo en el tejido.

Ha sido reportado que GSDMD se une a dominios de membrana enriquecidos en PIP2 en macrófagos [51]. Para evaluar esta interacción en las fibras musculares, nosotros realizamos una inmunofluorescencia contra PIP2 en los músculos estudiados. Como se muestra en la figura 5, un marcaje fluorescente rojo muestra la localización de PIP2 en las fibras musculares de todos los músculos analizados. Este marcaje presentó una distribución sarcolemal con un patrón definido. No se apreció una diferencia de intensidad de fluorescencia entre los músculos aislados desde NCD y HFD. La sobreposición de ambas imágenes fluorescentes mostró una colocalización sarcolemal para GSDMD y PIP2, sin observar cambios aparentes en la intensidad de fluorescencia para las condiciones NCD y HFD.

Evaluación de la distribución subcelular de IL-1 β en los distintos músculos estudiados. La activación del inflammasoma NLRP3 procesa IL-1 β a su forma activa [2]. Con la finalidad de observar la localización de IL-1 β nosotros llevamos a cabo una inmunofluorescencia contra esta proteína en los

músculos FDB, gastrocnemio, masetero y soleo (Fig. 6). Tanto en condición NCD como HFD, los músculos estudiados presentan un inmunomarcaje positivo rojo, con una distribución sarcolemal y un patrón definido. Además, se observa una mayor intensidad de fluorescencia en la condición de HFD respecto a los músculos en condición NCD en los cuatro músculos estudiados.

NLRP3 presenta mayor localización en las fibras de tipo II. Como se observó en la figura 4, la localización de NLRP3 presentó un patrón mosaico, nosotros realizamos una co-inmunofluorescencia para evaluar el tipo de fibra y la localización de NLRP3 (Fig. 5 y 6). El tipaje de las fibras para los músculos FDB, gastrocnemio, masetero y soleo fue el esperado, mostrando la distribución de BAD5 y SC71 acorde a la literatura. En las figuras 5 y 6, se muestra la sobreposición del inmunomarcaje para BAD5, SC71 y NLRP3. La sobreposición de NLRP y SC71 se exhibe con una tonalidad amarilla mientras que la superposición entre BAD5 y NLRP3 se exhibe en una tonalidad cian. De interés, se aprecia una mayor colocalización en las fibras inmunorreactivas para SC71, sugiriendo que NLRP3 presenta una mayor distribución en las fibras de tipo II.

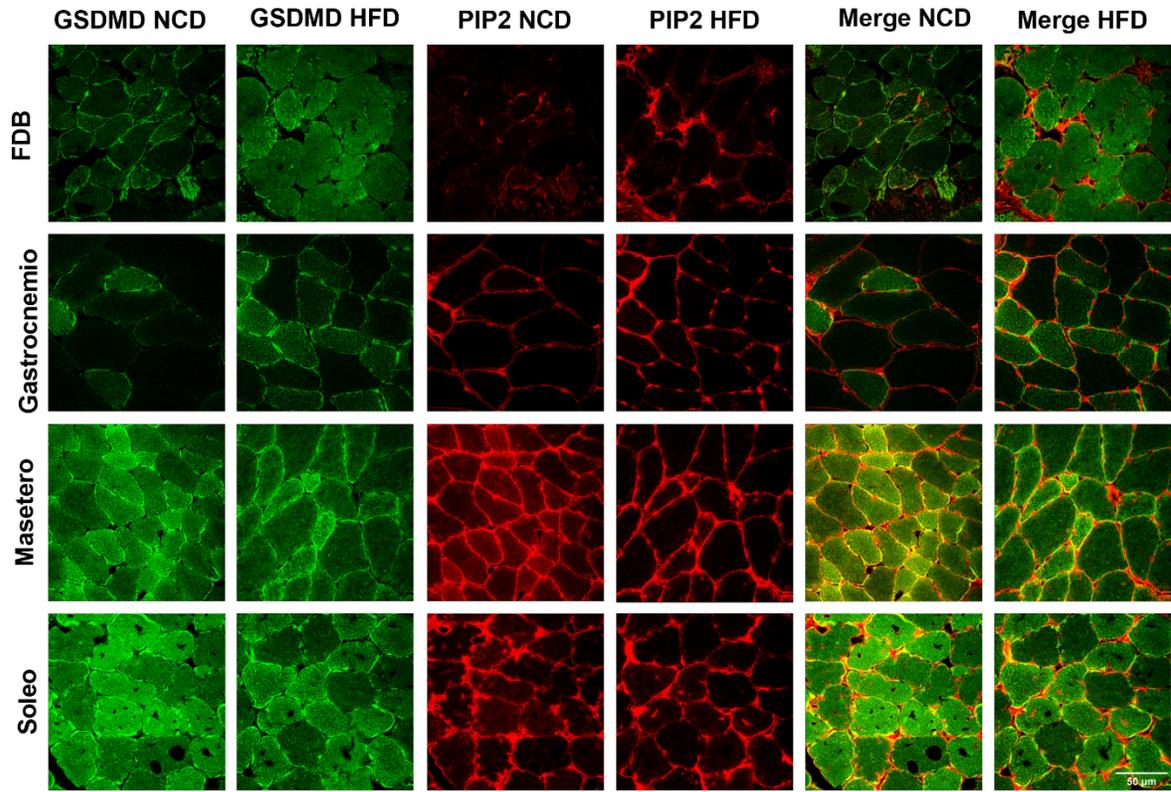


Figura 5: Co-localización de GSDMD y PIP2. Se observan imágenes representativas (40x) para el inmunomarcaje de GSDMD (marcaje verde) y PIP2 (marcaje rojo) en FDB, gastrocnemio, masetero y soleo respectivamente de ratones controles (NCD) y obesos (HFD), ambos con una dieta de 8 semanas.

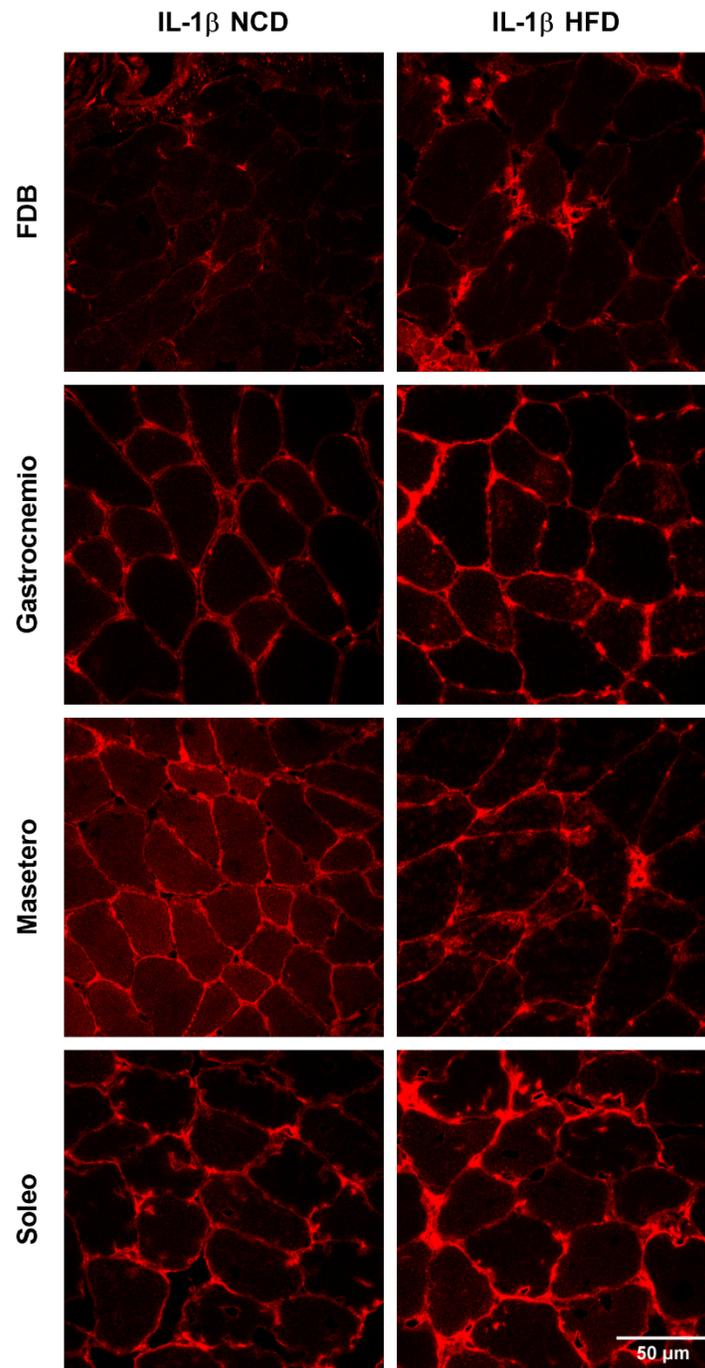


Figura 6: Inmunolocalización de IL-1 β . Se observan imágenes representativas (40x) para el inmunomarcaje de IL-1 β (marcaje rojo) en FDB, gastrocnemio, masetero y soleo respectivamente de ratones controles (NCD) y obesos (HFD), ambos con una dieta de 8 semanas.

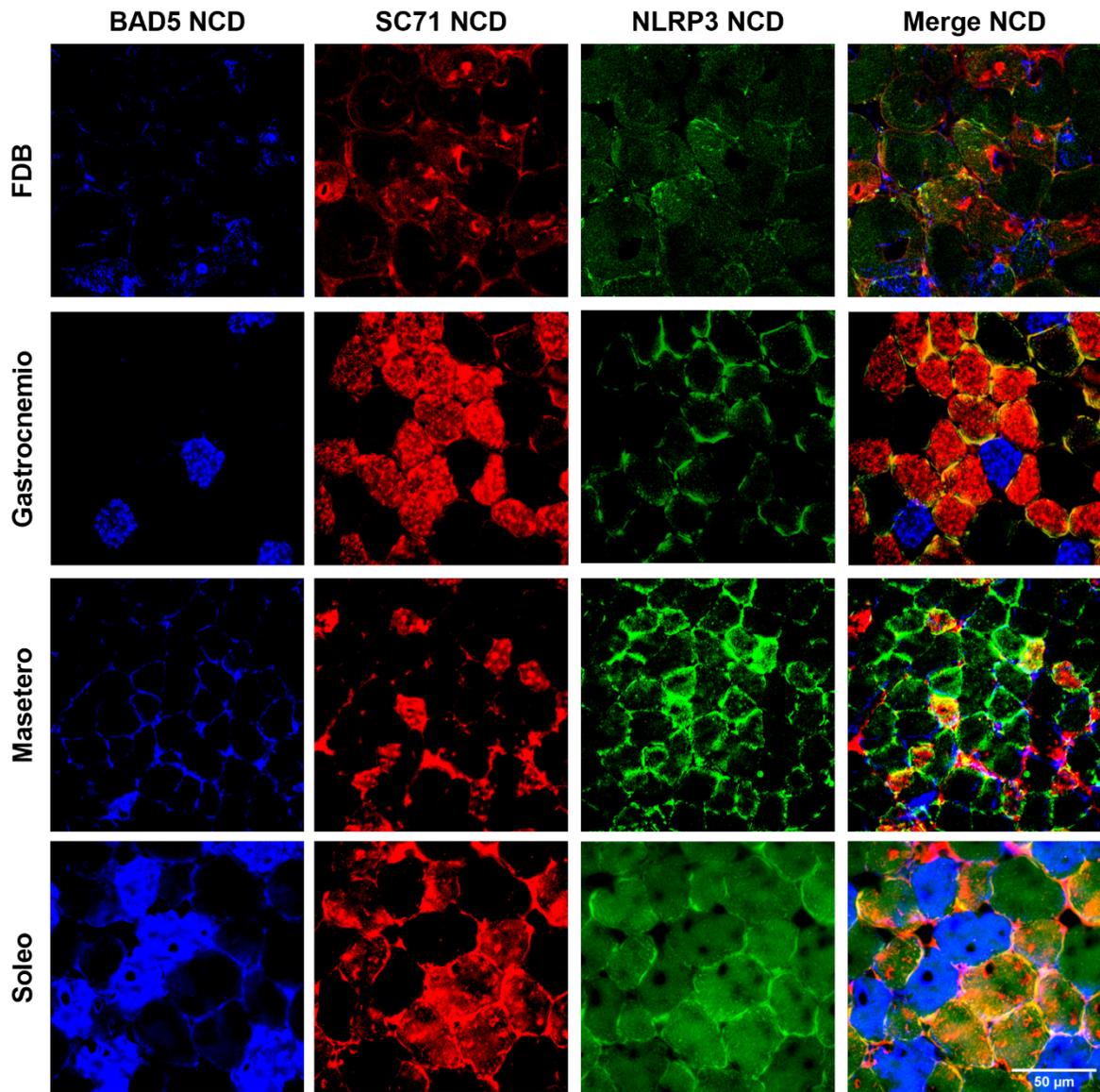


Figura 7: Co-localización de NLRP3 con fibras tipo I y tipo II en ratones control (NCD). Se observan imágenes representativas (40x) para el inmunomarcaje de NLRP3 (marcaje verde), BAD5 para fibras tipo I (marcaje azul) y SC71 para fibras tipo II (marcaje rojo) en FDB, gastrocnemio, masetero y soleo respectivamente de ratones controles (NCD).

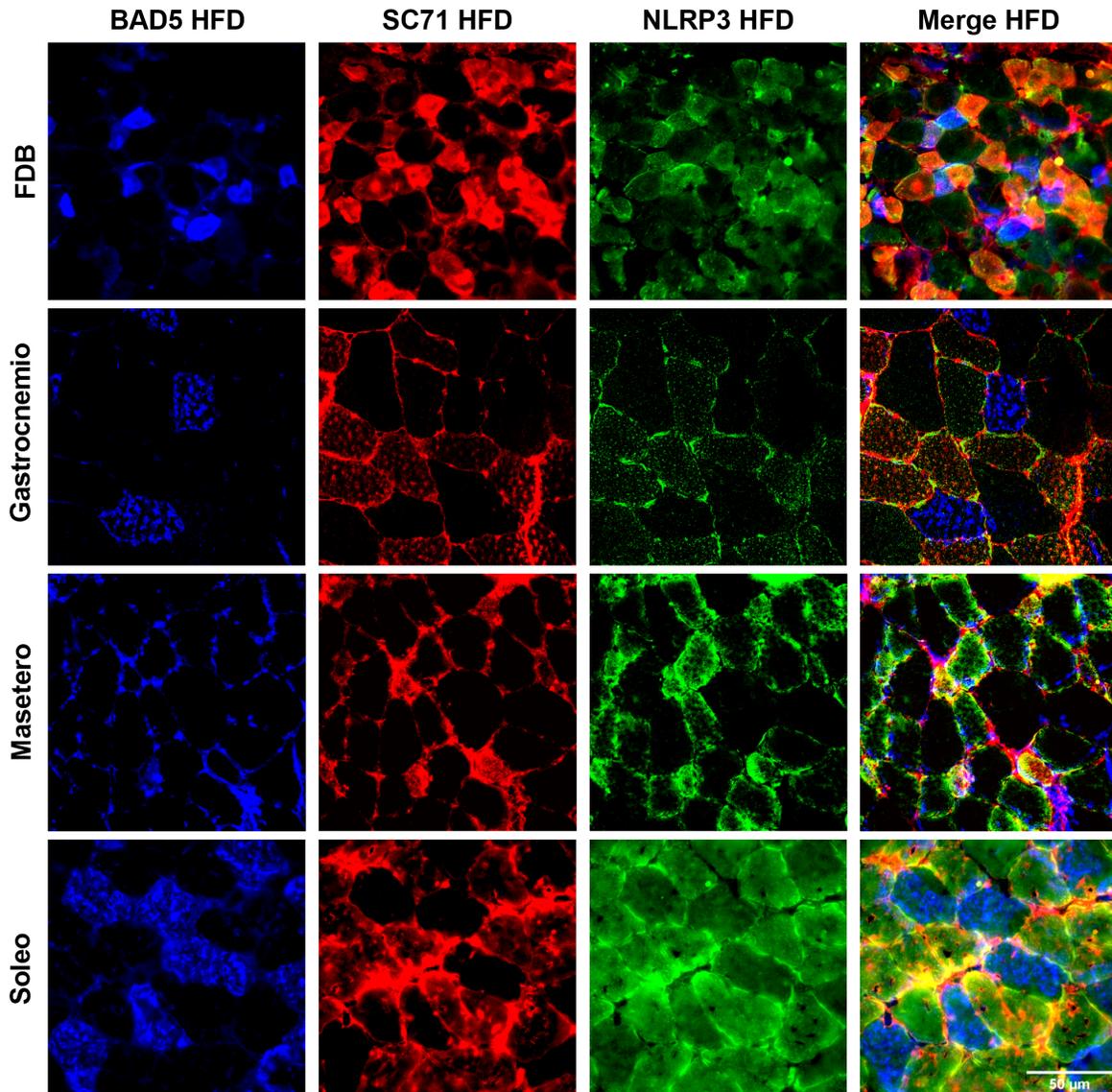


Figura 8: Co-localización de NLRP3 con fibras tipo I y tipo II en ratones obesos (HFD). Se observan imágenes representativas (40x) para el inmunomarcaje de NLRP3 (marcaje verde), BAD5 para fibras tipo I (marcaje azul) y SC71 para fibras tipo II (marcaje rojo) en FDB, gastrocnemio, masetero y soleo respectivamente de ratones obesos (HFD).

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó, por primera vez, la localización de NLRP3, GSDMD, TXNIP e IL-1 β en secciones transversales de los músculos FDB, gastrocnemio, masetero y soleo extraídos desde animales NCD y HFD. Estudiar estas proteínas ha sido nuestro principal foco puesto que el complejo inflamasoma y su actividad han tomado una creciente relevancia en la patogenia de enfermedades metabólicas.

Una alimentación experimental exclusiva con HFD por 8 semanas ha mostrado un desarrollo temprano de obesidad y establecimiento de una resistencia a la insulina en ratones ^[52]. En este trabajo nosotros replicamos este modelo encontrando variables fisiológicas y morfométricas alteradas en la condición HFD comparada con la condición NCD. Se observó un significativo aumento de peso acompañado con una alteración de la tolerancia a la glucosa, indicando un desarrollo de resistencia a la insulina en los ratones HFD. De interés, los ratones alimentados con HFD aumentaron los niveles plasmáticos de IL-1 β , sugiriendo un ambiente inflamatorio crónico de bajo grado. De acuerdo con la literatura, la resistencia a la insulina asociada a obesidad se caracteriza por un ambiente pro-inflamatorio de bajo grado o inflamación metabólica ^[52,53].

Se ha caracterizado al complejo NLRP3 como un nexo directo entre metabolismo e inflamación, teniendo un papel central en el desarrollo de inflamación asociada a obesidad ^[2]. En nuestros resultados se observó un inmunomarcaje positivo específico para NLRP3 tanto en condición NCD como HFD. Sin embargo, en condición HFD la intensidad del inmunomarcaje para NLRP3 fue mayor respecto a lo observado en la condición NCD, esto sugiere que existe una mayor distribución de NLRP3 en los ratones obesos tal como se ha descrito previamente en la literatura ^[2,52]. Por otro lado, el inmunomarcaje para NLRP3 presentó un patrón heterogéneo y en mosaico, sugiriendo una distribución diferencial de esta proteína en las fibras musculares estudiadas. En el músculo FDB se observó un

inmunomarcaje para NLRP3 de menor intensidad en el sarcolema respecto a los demás músculos, sugerimos que esto ocurrió debido posiblemente a un artefacto de técnica durante la congelación del tejido. Dada las características de este músculo, en particular su tamaño y volumen de alrededor de 7,8 mm³ [54], tuvimos inconvenientes para establecer los tiempos y temperaturas para su óptima congelación. Para corregir estos artefactos en el futuro, proponemos realizar una congelación de estos músculos siendo previamente embebidos en una abundante capa *optimal cutting temperature compound* (OCT). Algunos estudios han sugerido que la activación del inflamasoma NLRP3 podría impactar en la señalización por insulina y en el transporte de glucosa [2,52]. Esta activación podría ser crucial para comprender los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a la insulina producida en el músculo esquelético.

Por co-inmunofluorescencia se evaluó la distribución de NLRP3 con relación al tipaje de fibras para cada músculo. Tanto en NCD como en HFD se observó una mayor co-localización de NLRP3 con SC71, lo que sugiere una mayor distribución de NLRP3 en fibras tipo II. Este resultado no ha sido previamente descrito para el modelo animal obeso insulino resistente utilizado en este estudio. Sin embargo, ha sido reportada previamente una relación entre NLRP3 y el metabolismo glucolítico de las fibras tipo II [55, 56]. Mc Bride et al., demostraron la necesidad del complejo NLRP3 en fibras tipo II de músculos esqueléticos para un aumento de la actividad de caspasa-1 relacionado al envejecimiento, medido por el clivaje de algunas enzimas involucradas en la glicolisis [55]. De Biase et al., mediante una serie de experimentos enfocados también al envejecimiento celular demuestran la mayor presencia de NLRP3 en fibras tipo II de músculo esquelético proponiendo una relación directa entre el complejo NLRP3 y al metabolismo glucolítico alterado en estas fibras [56]. De interés, la resistencia a la insulina ha sido propuesta con un proceso de envejecimiento prematuro de algunos tejidos [57]. Debido principalmente a una limitación de tiempo, no se pudo llevar a cabo una cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las muestras estudiadas, ni se pudo evaluar el subtipo de tipaje de fibras en los

músculos que indiquen con mayor precisión la distribución de nuestras proteínas de interés. Dada la creciente atención de parte de investigaciones en torno a NLRP3 como un blanco clave para tratamientos contra patologías metabólicas y musculares asociadas al ambiente inflamatorio producido por este complejo, se vuelve de alta utilidad manejar la información respecto a la distribución diferencial de NLRP3 en las distintas fibras musculares. Sin embargo, es claro que se necesita profundizar respecto de estos resultados y seguir realizando estudios para determinar específicamente la distribución de NLRP3 entre los distintos tipos de fibras tipo II e incluso dilucidar la relación directa de esta asociación del complejo por las fibras tipo II en condición de obesidad.

Frente al aumento de NLRP3 en los músculos estudiados y posible activación de caspasa-1 en condición HFD es esperable que los niveles de IL-1 β se encuentren aumentados en esta condición [2,51,58]. De manera concordante, los resultados obtenidos y mostrados en la figura 6 exhiben el aumento de la intensidad de fluorescencia aparente del inmunomarcaje en los cuatro músculos estudiados en condición HFD respecto a aquellos en condición NCD. La mayoría del marcaje específico para IL-1 β en HFD se distribuye a nivel del sarcolema y alrededor de éste en la célula muscular. No obstante, se ha descrito en la literatura que IL-1 β carece de un péptido de señalización requerido para su secreción mediante las vías de secreción clásicas [33] y se ha sugerido que su secreción es mediante métodos menos convencionales como el mediado por poros formados por la proteína GSDMD [34] estudiada en esta tesis.

De acuerdo con lo descrito en la literatura, en condición de inflamación crónica de bajo grado, GSDMD se transloca e inserta en la membrana celular donde forma poros y permite la salida de IL-1 β tras la activación proteolítica por la actividad de caspasa-1 [34,35]. Es esperable que en la condición HFD este fenómeno ocurra en las fibras musculares esqueléticas. De manera concordante, en nuestros

resultados obtenidos, GSDMD se encuentra localizada mayormente a nivel del sarcolema en condición HFD. Para apoyar la localización de membrana de GSDMD se realizó una co-inmunofluorescencia con PIP2, un componente fosfolipídico esencial de la membrana celular que regula a otros fosfolípidos y sus funciones de señalización ^[59]. Los resultados obtenidos muestran una colocación en el sarcolema. Por otro lado, analizando las intensidades del marcaje de GSDMD entre los distintos músculos e incluso entre las distintas fibras dentro de cada músculo, observamos una distribución evidentemente heterogénea. Esto último nos hace suponer que al igual que la localización de NLRP3 podría existir un aumento diferencial de GSDMD de acuerdo con el tipo de fibra donde se exprese y traduzca. Sin embargo, es necesaria mayor investigación al respecto para evaluar dicho supuesto.

De acuerdo con la literatura, la obesidad está relacionada a un incremento en la producción de ROS ^[60]. El aumento del estado oxidativo celular induce la disociación entre TXNIP/TRX para llevar a la interacción entre TXNIP/NLRP3 y posteriormente a la activación del complejo inducido por ROS ^[2]. En las microfotografías del inmunomarcaje para TXNIP, se observaron resultados variables con un aumento de intensidad aparente para el músculo FDB y soleo, una disminución de intensidad aparente para el músculo masetero y sin cambios de intensidad aparente para gastrocnemio en condición HFD respecto NCD. Se ha descrito que la expresión de TXNIP se ve modulada tanto por insulina (disminuyéndola) como por glucosa (aumentándola), esperando así, que no exista una mayor variación en estas condiciones estudiadas [58]. En nuestro estudio, no pudimos encontrar resultados concluyentes respecto a la comparación de las dos condiciones.

En resumen, nuestros resultados muestran que todas las proteínas estudiadas se encuentran presentes en los músculos esqueléticos y que se encuentran diferencialmente localizadas dependiendo del tipaje de fibra y de la condición de resistencia a la insulina. Futuros estudios derivados de esta tesis exploratoria

permitirán establecer con mayor precisión la expresión, abundancia y actividad del complejo inflamasoma NLRP3 y de las proteínas que promueven su modulación junto con la liberación de IL-1 β .

CONCLUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

1. Ogurtsova, K.; da Rocha Fernandes, J.D.; Huang, Y.; Linnenkamp, U.; Guariguata, L.; Cho, N.H.; Cavan, D.; Shaw, J.E.; Makaroff, L.E. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2017, 128, 40–50.
2. Jorquera, G.; Russell, J.; Monsalves-Alvarez, M.; Cruz, G.; Valladares-Ide, D.; Basualto-Alarcon, C.; Barrientos, G.; Estrada, M.; Llanos, P. NLRP3 Inflammasome: Potential Role in Obesity Related Low-Grade Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3254.
3. DeFronzo, R.A.; Tripathy, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009, 32 (Suppl. 2), S157–S163
4. Klip, A.; Sun, Y.; Chiu, T.T.; Foley, K.P. Signal transduction meets vesicle traffic: The software and hardware of GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2014, 306, C879–C886
5. Karlsson, H.K.; Zierath, J.R.; Kane, S.; Krook, A.; Lienhard, G.E.; Wallberg-Henriksson, H.

Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2005, 54, 1692–1697.

6. Garvey, W.T.; Maianu, L.; Zhu, J.H.; Brechtel-Hook, G.; Wallace, P.; Baron, A.D. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J. Clin. Investig.* 1998, 101, 2377–2386.
7. Zierath, J.R.; He, L.; Gumà, A.; Odegaard Wahlström, E.; Klip, A.; Wallberg-Henriksson, H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996, 39, 1180–1189.
8. Gregor, M.F.; Hotamisligil, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29, 415–445.
9. Jorquera, G.; Meneses-Valdés, R.; Rosales-Soto, G.; Valladares-Ide, D.; Campos, C.; Silva-Monasterio, M.; Llanos, P.; Cruz, G.; Jaimovich, E.; Casas, M. High extracellular ATP levels released through pannexin-1 channels mediate inflammation and insulin resistance in skeletal muscle fibers of diet induced obese mice. *Diabetologia* 2021. Jun;64(6):1389-1401.
10. Hirosumi, J.; Tuncman, G.; Chang, L.; Görgün, C.Z.; Uysal, K.T.; Maeda, K.; Karin, M.; Hotamisligil, G.S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002, 420, 333–336.
11. Sabio, G.; Kennedy, N.J.; Cavanagh-Kyros, J.; Jung, D.Y.; Ko, H.J.; Ong, H.; Barrett, T.; Kim, J.K.; Davis, R.J. Role of muscle c-Jun NH2-terminal kinase 1 in obesity-induced insulin resistance. *Mol. Cell Biol.* 2010, 30, 106–115
12. Nandipati, K.C.; Subramanian, S.; Agrawal, D.K. Protein kinases: Mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Mol. Cell Biochem.* 2017, 426, 27–45.

13. Wu, H.; Ballantyne, C.M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J.Clin. Investig.* 2017, 127, 43–54.
14. Green, C.J.; Pedersen, M.; Pedersen, B.K.; Scheele, C. Elevated NF- κ B activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2011, 60, 2810–2819.
15. Ciaraldi, T.P.; Ryan, A.J.; Mudaliar, S.R.; Henry, R.R. Altered Myokine Secretion Is an Intrinsic Property of Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 2016, 11, e0158209.
16. Pedersen, B.K.; Febbraio, M.A. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012, 8, 457–465.
17. Pedersen, B.K. Muscle as a secretory organ. *Compr. Physiol.* 2013, 3, 1337–1362.
18. Ye, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front. Med.* 2013, 7, 14–24
19. Solinas, G.; Karin, M. JNK1 and IKKbeta: Molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2010, 24, 2596–2611.
20. Lang, C.H.; Silvis, C.; Deshpande, N.; Nystrom, G.; Frost, R.A. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock* 2003, 19, 538–546.
21. Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, Adams SH, Hwang DH. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* 2012 Sep;53(9):2002-13.
22. Kim, S.J.; Choi, Y.; Jun, H.S.; Kim, B.M.; Na, H.K.; Surh, Y.J.; Park, T. High-fat diet stimulates IL-1 type I receptor-mediated inflammatory signaling in the skeletal muscle of mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, 1014–1020.

23. Haneklaus, M.; O'Neill, L.A. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol. Rev.* 2015, 265, 53–62.
24. Grant, R.W.; Dixit, V.D. Mechanisms of disease: Inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front. Immunol.* 2013, 4, 50.
25. Duewell, P.; Kono, H.; Rayner, K.J.; Sirois, C.M.; Vladimer, G.; Bauernfeind, F.G.; Abela, G.S.; Franchi, L.; Nuñez, G.; Schnurr, M.; et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010, 464, 1357–1361.
26. Coll, R.C.; Robertson, A.A.; Chae, J.J.; Higgins, S.C.; Muñoz-Planillo, R.; Inserra, M.C.; Vetter, I.; Dungan, L.S.; Monks, B.G.; Stutz, A.; et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 2015, 21, 248–255.
27. Jo, E.K.; Kim, J.K.; Shin, D.M.; Sasakawa, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol. Immunol.* 2016, 13, 148–159.
28. Hornung, V.; Latz, E. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *Eur. J. Immunol.* 2010, 40, 620–623.
29. Guarda, G.; Zenger, M.; Yazdi, A.S.; Schroder, K.; Ferrero, I.; Menu, P.; Tardivel, A.; Mattmann, C.; Tschopp, J. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J. Immunol.* 2011, 186, 2529–2534.
30. Song, N.; Li, T. Regulation of NLRP3 Inflammasome by Phosphorylation. *Front. Immunol.* 2018, 9, 2305.
31. Ozaki, E.; Campbell, M.; Doyle, S.L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: Current perspectives. *J. Inflamm. Res.* 2015, 8, 15–27.
32. Tschopp, J.; Schroder, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple

- signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 2010, 10, 210–215.
33. Evavold, C.L.; Ruan, J.; Tan, Y.; Xia, S.; Wu, H.; Kagan, J.C. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* 2018, 48, 35–44.
34. Kuriakose, T.; Kanneganti, T.D. Gasdermin D Flashes an Exit Signal for IL-1. *Immunity* 2018, 48, 1–3
35. Ramos-Junior, E.S.; Morandini, A.C. Gasdermin: A new player to the inflammasome game. *Biomed. J.* 2017, 40, 313–316.
36. Marseglia, L.; Manti, S.; D'Angelo, G.; Nicotera, A.; Parisi, E.; Di Rosa, G.; Gitto, E.; Arrigo, T. Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 16, 378–400.
37. McMurray, F.; Patten, D.A.; Harper, M.E. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity* 2016, 24, 2301–2310.
38. Diaz-Vegas, A.; Sanchez-Aguilera, P.; Krycer, J.R.; Morales, P.E.; Monsalves-Alvarez, M.; Cifuentes, M.; Rothermel, B.A.; Lavandero, S. Is Mitochondrial Dysfunction a Common Root of Noncommunicable Chronic Diseases? *Endocr. Rev.* 2020, 41.
39. Tschopp, J.; Schroder, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 2010, 10, 210–215
40. Zhou, R.; Tardivel, A.; Thorens, B.; Choi, I.; Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* 2010, 11, 136–140.
41. Elshaer, S.L.; Mohamed, I.N.; Coucha, M.; Altantawi, S.; Eldahshan, W.; Bartasi, M.L.; Shanab, A.Y.; Lorys, R.; El-Remessy, A.B. Deletion of TXNIP Mitigates High-Fat Diet- Impaired

- Angiogenesis and Prevents Inflammation in a Mouse Model of Critical Limb Ischemia. *Antioxidants* 2017, 6, 47.
42. Li, L.; Ismael, S.; Nasoohi, S.; Sakata, K.; Liao, F.F.; McDonald, M.P.; Ishrat, T. Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) Associated NLRP3 Inflammasome Activation in Human Alzheimer's Disease Brain. *J. Alzheimer's Dis.* 2019, 68, 255–265.
43. Parikh, H.; Carlsson, E.; Chutkow, W.A.; Johansson, L.E.; Storgaard, H.; Poulsen, P.; Saxena, R.; Ladd, C.; Schulze, P.C.; Mazzini, M.J.; et al. TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med.* 2007, 4, e158.
44. Litwiniuk, A.; Bik, W.; Kalisz, M.; Baranowska-Bik, A. Inflammasome NLRP3 Potentially Links Obesity-Associated Low-Grade Systemic Inflammation and Insulin Resistance with Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 5603
45. Xiao, Junjie. (2020). Physical Exercise for Human Health. 10.1007/978-981-15-1792-1.
46. Stefano Schiaffino and Carlo Reggiani; Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews* 2011 91:4, 1447-1531.
47. Tarpey, M.D., Amorese, A.J., Balestrieri, N.P. *et al.* Characterization and utilization of the flexor digitorum brevis for assessing skeletal muscle function. *Skeletal Muscle* 8, 14 (2018).
48. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of Type2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health.* 2020 Mar;10(1):107-111.
49. Organización mundial de la salud. (2021, June 9). *Obesidad y sobrepeso*. Retrieved November 5, 2021, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
50. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. (2019). *El Estado de la*

Seguridad Alimentaria y Nutrición en el Mundo 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO.

51. Monteleone M, Stanley AC, Chen KW, Brown DL, Bezbradica JS, von Pein JB, Holley CL, Boucher D, Shakespear MR, Kapetanovic R, Rolfes V, Sweet MJ, Stow JL, Schroder K. Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep*. 2018 Aug 7;24(6):1425-1433.
52. Americo-Da-Silva L, Aguilera J, Quinteros-Waltemath O, Sanchez-Aguilera P, Russell J, Cadagan C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome increases the IL-1beta level and decreases GLUT4 translocation in skeletal muscle during insulin resistance. *Int J Mol Sci* (2021) 22(19).
53. Nov, O.; Shapiro, H.; Ovadia, H.; Tarnovski, T.; Dvir, I.; Shemesh, E.; Kovsan, J.; Shelef, I.; Carmi, Y.; Voronov, E.; et al. Interleukin1beta regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. *PLoS ONE* 2013, 8.
54. Tarpey MD, Amorese AJ, Balestrieri NP, Ryan TE, Schmidt CA, McClung JM, Spangenburg EE. Characterization and utilization of the flexor digitorum brevis for assessing skeletal muscle function. *Skelet Muscle*. 2018 Apr 17;8(1):14.
55. McBride, M.J.; Foley, K.P.; D'Souza, D.M.; Li, Y.E.; Lau, T.C.; Hawke, T.J.; Schertzer, J.D. The NLRP3 Inflammasome Contributes to Sarcopenia and Lower Muscle Glycolytic Potential in Old Mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2017, 313, E222–E232.
56. De Biase, D.; Piegari, G.; Prisco, F.; Cimmino, I.; d'Aquino, I.; Baldassarre, V.; Oriente, F.; Papparella, S.; Paciello, O. Implication of the NLRP3 Inflammasome in Bovine Age-Related Sarcopenia. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 3609.
57. He M, Chiang HH, Luo H, Zheng Z, Qiao Q, Wang L, Tan M, Ohkubo R, Mu WC, Zhao S, Wu

- H, Chen D. An Acetylation Switch of the NLRP3 Inflammasome Regulates Aging-Associated Chronic Inflammation and Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2020 Mar 3;31(3):580-591.
58. Fantuzzi, G.; Dinarello, C.A. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: Two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J. Clin. Immunol.* 1999, 19, 1–11.
59. Meng H, Janssen PM, Grange RW, Yang L, Beggs AH, Swanson LC, Cossette SA, Frase A, Childers MK, Granzier H, Gussoni E, Lawlor MW. Tissue triage and freezing for models of skeletal muscle disease. *J Vis Exp.* 2014 Jul 15;(89):51586.
60. Rendra E, Riabov V, Mossel DM, Sevastyanova T, Harmsen MC, Kzhyshkowska J. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology.* 2019 Mar;224(2):242-253.
61. Mandal K. Review of PIP2 in Cellular Signaling, Functions and Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 6;21(21):8342.

ANEXO

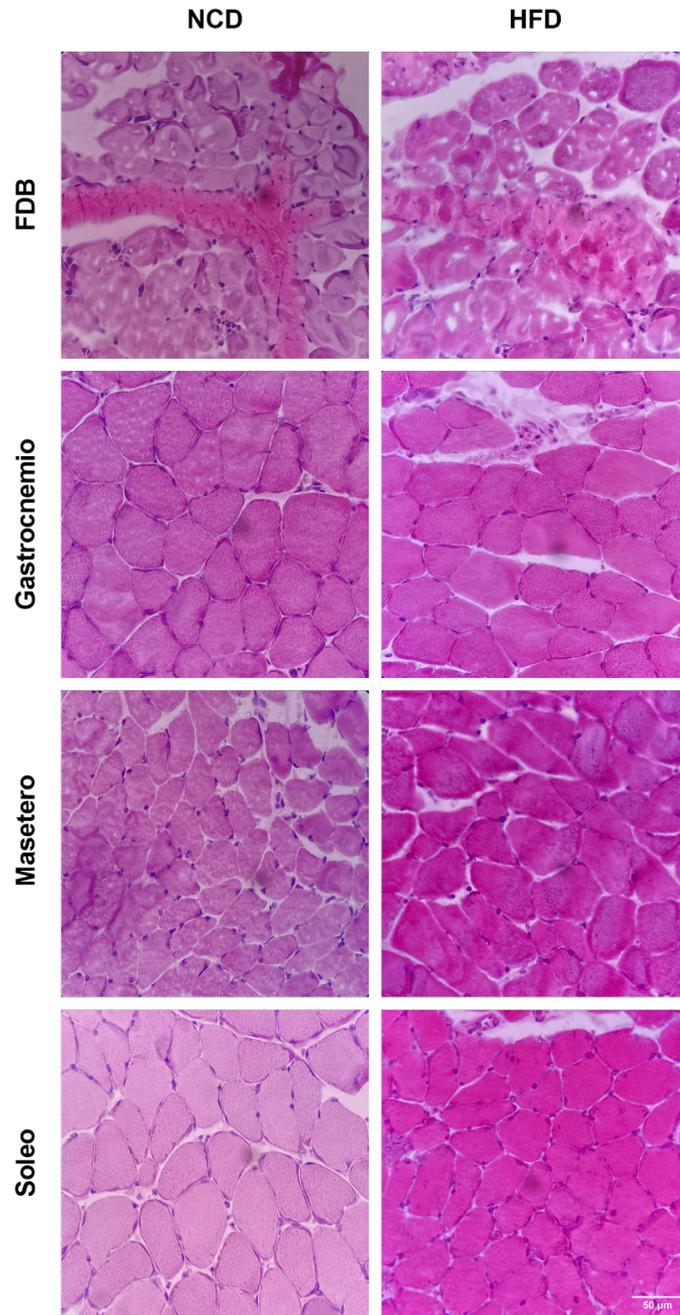


Figura 9. Fotografías representativas de tinción hematoxilina eosina. Se observan imágenes representativas para los músculos FDB, gastrocnemio, masetero y soleo con tinción de hematoxilina eosina a un aumento de 40x. En cada imagen se tiñe de un tono morado los núcleos de las células mientras que de un tono rosado variable se tiñe el citoplasma de estas. En el músculo FDB se observan notables artefactos de técnica por congelación.

Santiago, 4 de junio de 2019

Certificado N°: **19273-MED-UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1065 FMUCH**, del Proyecto de Investigación titulado: ***"Inflammasoma NLRP3 en el músculo esquelético: Un nuevo vínculo entre la acumulación de colesterol y el transporte defectuoso de glucosa mediado por insulina en la resistencia a la insulina"***, de la Investigadora Responsable **Dra. Paola Llanos**, Profesora Asistente, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **800** ratones *Mus musculus* de la cepa **C57BL/6**, provenientes de Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde junio de 2019 a abril de 2023, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por Proyecto **Fondecyt Regular Nro. 1190406**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.



Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile