

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“PAPEL DE ABCA1 EN EL CONTENIDO DE COLESTEROL DE
MEMBRANA Y EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA MEDIADA
POR GLUT4 EN FIBRAS MUSCULARES DE RATONES
ADULTOS”**

PABLO IGNACIO SANCHEZ AGUILERA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLOGIA

Director de Tesis: Prof. Dra. Paola Llanos Vidal

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

PABLO IGNACIO SANCHEZ AGUILERA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Fisiología** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 10 de Marzo de 2017.

Prof. Dra. Paola Llanos V.

Directora de Tesis

Instituto de Ciencias Odontológicas, ICOD
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. GENARO BARRIENTOS

PROF. DRA. DOLORES BUSSO

PROF. DRA. ALEJANDRA ESPINOSA

PROF. DRA. GLADYS TAPIA
Presidente Comisión de Examen

“La ciencia es una sola luz, e iluminar con ella cualquier parte, es iluminar con ella el mundo entero”.

Isaac Asimov

1920-1992

A mi familia por los valores que ninguna institución puede entregarme, por su compañía y amor. A mis amigos por el respiro necesario y el consejo preciso. Y a ella por su amor incondicional, por creer en mí y darme la confianza en mis capacidades.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de todas las personas que me han rodeado en esta etapa de mi vida, quiero agradecer ...

A mi directora de tesis, la doctora Paola Llanos Vidal, por ser un pilar fundamental en mi incipiente formación como científico. Me enseñó la importancia de la rigurosidad, de no tener miedo al error y de la importancia de planificar en ciencia. Me dio la oportunidad de aprender de un mundo increíble y lleno de desafíos como lo es el trabajo de laboratorio, y específicamente del metabolismo del colesterol en el músculo. Ella también fue mi referente valórico, basando todos sus actos en la pasión que tiene por la ciencia y por el trabajo con sus compañeros de equipo. Le agradezco sinceramente todo lo que he aprendido en este proceso y sé que siempre podré confiar en ella tanto en lo profesional como personal.

A mi comisión revisora de tesis, a los doctores Genaro Barrientos, Dolores Busso, Alejandra Espinosa y Gladys Tapia, por su aporte minucioso en todas las fases de revisión de mi tesis y por su disposición abierta a responder mis inquietudes. Ellos han sido en parte la motivación de seguir con mis estudios en esta área.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Alexis Díaz, Cristian Campos, Giovanni Rosales, Denisse Valladares, Manuel Arias, Hugo Cerda, Francisco Jaque, Ignacio Contreras, Erick Vergara, Fernanda Álvarez, Jennifer Troc, Yildy Utreras, y a las doctoras Mariana Casas y Andrea del Campo ya que sin ellos no podría haber finalizado con éxito este proceso. Todos ellos han estado detrás de cada experimento, cada protocolo realizado y cada paso que he dado dentro del laboratorio. Siempre abiertos a escucharme, apoyarme y motivarme en los momentos felices como en los difíciles. También encontré en ellos un grupo valioso y sincero de amigos en los que he podido confiar y de los cuales he aprendido enseñanzas aplicables tanto al laboratorio como a la vida misma. Gracias por aguantar mi impulsividad y nerviosismo.

A los doctores Cecilia Hidalgo y Enrique Jaimovich, que junto a mi directora han sido mis referentes en ciencia. Por entregar de manera desinteresada sus conocimientos, su crítica constructiva y su preciado tiempo.

A mis padres Pablo Sánchez y Mirta Aguilera y a mis hermanos Tomas, Simón y Juan José, que aunque miran de lejos mi trabajo sé que no paso desapercibido, que están pendientes de mi progreso y de mi futuro. Les agradezco de ser como soy hoy en día, gracias a sus enseñanzas tengo las cualidades que me han ayudado en todo este proceso. También les agradezco el amor que me han entregado, que ha sido la fortaleza que he necesitado en los momentos difíciles.

A mis amigos de la vida, los que siempre están conmigo sin importar mis logros y mis derrotas, ellos saben quiénes son y les agradezco por los momentos de ocio y risas.

Por último, a la mujer que amo, María José Garín, que ha sido mi compañera en todo este proceso de tesis, quien me da la motivación, aguanta mis días de estrés y me da la confianza que necesito. Parte de este trabajo está dedicado a ella.

Gracias a todos los que estuvieron a mi lado y que de alguna manera aportaron y apoyaron mi trabajo tras bambalinas.

Gracias por todo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	6
1. TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL.....	7
La lipoproteína de alta densidad como principal aceptor plasmático de colesterol8	
ABCA1 y su importancia en el transporte reverso de colesterol	9
2. EL MUSCULO ESQUELETICO COMO GRAN CAPTADOR DE GLUCOSA ..	11
Mecanismos descritos para el transporte de glucosa en el músculo esquelético	11
3. HIPOTESIS DE LOS MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN EL MUSCULO ESQUELETICO	13
Colesterol de membrana y su papel en la captación de glucosa en fibras musculares	13
HIPOTESIS	16
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS	18
MATERIALES Y METODOS	22
RESULTADOS	29
Disminución de la expresión de ABCA1 en el músculo esquelético de ratones insulino resistentes.....	30
shABCA1 disminuye el contenido de ABCA1 en el FDB.....	35
ABCA1 regula el contenido de colesterol de la membrana en las fibras del músculo esquelético.....	35
shABCA1 disminuye la fosforilación de Akt por insulina.	35
La presencia de ABCA1 es requerida para el transporte de glucosa mediado por GLUT4 en fibras musculares aisladas.	36
DISCUSION	41
CONCLUSION	47
PRESENTACIONES EN CONGRESOS	49
MANUSCRITOS	51
BIBLIOGRAFIA	53
ANEXOS	65

RESUMEN

El transportador ATP *Binding Cassette A1* (ABCA1) facilita el flujo de salida de colesterol hacia las apolipoproteínas A-1 (apoA-1) libre de lípidos, siendo una proteína de membrana esencial en las etapas iniciales de la biogénesis de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*, de sus siglas en inglés). Evidencia reciente sugiere que ABCA1 regula el contenido lipídico, la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo. La mayor parte del transporte de glucosa mediado por GLUT4 ocurre en los túbulos transversales (TT), un sistema de membrana especializado enriquecido en colesterol y esfingolípidos presente en las células del músculo esquelético. De manera interesante, el contenido de colesterol en los TT está aumentado en ratones con resistencia a la insulina (RI). Sin embargo, aún es desconocido el papel de ABCA1 en el metabolismo de la glucosa del músculo esquelético.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el papel funcional del transportador ABCA1 sobre la homeostasis de la glucosa y la acumulación de colesterol en el músculo esquelético. Ratones C57BL/6J fueron alimentados por 8 semanas con una dieta control (NCD, *Normal Chow Diet*, de sus siglas en inglés) o una dieta alta en grasas (HFD, *High Fat Diet*, de sus siglas en inglés). Se realizaron ensayos de qPCR y Western blot sobre homogeneizados del músculo completo e inmunofluorescencia en fibras aisladas de músculo. Los ratones alimentados con NCD fueron electroporados con plasmidios *shABCA1-RFP* o *scrambled* y posteriormente se evaluó la vía de señalización dependiente de insulina, la captación de glucosa medida por 2-NBDG y el contenido de colesterol con la tinción de Filipina III en fibras aisladas del músculo *flexor digitorum brevis* (FDB).

Los niveles de ARNm y el contenido de ABCA1 fue menor en los homogeneizados de músculo de ratones alimentados con HFD comparado con los ratones alimentados con NCD. ABCA1 fue localizado en los TT de fibras aisladas de FDB y la inmunotinción fue menor en fibras provenientes de músculos de ratones HFD comparados con los NCD. La electroporación *in vivo* del plasmidio *shABCA1-RFP* de los músculos FDB de ratones NCD resultó en una disminución del 70% del contenido de la proteína ABCA1, con un aumento de 1,6 veces el contenido de colesterol y una

disminución de la fosforilación de Akt y de la captación de 2-NBDG dependiente de insulina, comparada con las fibras electroporadas con el plasmidio *scrambled*-RFP.

Basado en estos resultados concluimos que ABCA1 regula el contenido de colesterol y afecta la captación de glucosa en fibras aisladas de músculo esquelético. La evidencia presentada en este trabajo, podría ayudarnos a definir si los cambios en la expresión/función de ABCA1 contribuye a la acumulación anómala de colesterol y el transporte alterado de glucosa, observado en las membranas de los TT del músculo esquelético en una condición de RI.

ABSTRACT

The ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) allows membrane cholesterol efflux to lipid-poor apolipoprotein A-1 (apoA-1), an essential protein in the initial stages of high-density lipoproteins (HDL) biogenesis. Recent reports indicate that ABCA1 regulates the lipid content, glucose tolerance and insulin sensitivity in adipose tissue. Most GLUT4-mediated glucose transport occurs in the transverse tubules (TT), a specialized membrane system enriched in cholesterol and sphingolipids present in skeletal muscle fibers. Interestingly, the TT cholesterol content is increased in insulin resistant mice. However, the role of ABCA1 on skeletal muscle glucose metabolism remains unknown.

The main aim in this work was to evaluate the role of ABCA1 protein on glucose homeostasis and membrane cholesterol content in skeletal muscle fibers. C57BL/6J male mice were fed for 8 weeks with Normal Chow Diet (NCD) or with High Fat Diet (HFD). qPCR, Western blot and immunocytochemistry assays were performed on skeletal muscle homogenates and isolated skeletal fibers from *flexor digitorum brevis* (FDB), respectively. NCD-fed mice were electroporated with *sh*ABCA1-RFP or scrambled plasmids, and insulin-dependent signaling pathway, cholesterol content through filipin III stain and 2-NBDG uptake were evaluated in cultured muscle fibers.

Compared to NCD-fed mice, ABCA1 mRNA levels and protein content were decreased in muscle homogenates isolated from HFD-fed mice. In addition, ABCA1 was located in TT systems. In FDB muscle from NCD-fed mice, *sh*ABCA1-RFP in vivo electroporation resulted in 70% decreased ABCA1 protein content, 1.6-fold increased cholesterol levels, reduced Akt phosphorylation and total suppression of insulin dependent-2-NBDG uptake, compared to fibers electroporated with the scrambled plasmid.

Based in these results we conclude that ABCA1 regulates cholesterol content and affects glucose uptake in isolated muscle fibers. The evidence showed in this work, may help to define if the changes in the ABCA1 expression/function contribute to the anomalous cholesterol accumulation and altered glucose transport displayed by skeletal muscle TT membranes in the IR condition.

INTRODUCCION

1. TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL

El TRC se define como el proceso en el cual el colesterol y otros lípidos son transportados desde las células de los diferentes tejidos hasta el hígado, donde los hepatocitos extraen las moléculas lipídicas desde las HDL para luego excretarlas en la secreción biliar (1,2).

El colesterol es el esteroil más abundante en las células de los mamíferos, precursor para la síntesis de hormonas, ácidos biliares y vitamina D, y un componente estructural de las membranas plasmáticas que le confiere propiedades físico-químicas específicas (3,4). Además, es un regulador clave de la fluidez de membrana y forma parte de estructuras especializadas tales como las balsas lipídicas y caveolas (4). El colesterol presente en las células de los tejidos proviene de dos fuentes principales. Aproximadamente la mitad de los esteroides son sintetizados de *novo* principalmente, donde la enzima hidroxi metilglutaril CoA reductasa (HMG CoA reductasa) es determinante en este proceso. La síntesis de colesterol ocurre tanto en el citoplasma como en el retículo endoplásmico y está regulada por los niveles de esteroides presente en las células (5). Lo restante proviene de la absorción derivada de la ingesta de lípidos y de su transporte por las lipoproteínas asociadas a apoproteínas B (4).

El TRC está dividido en 3 fases. La primera fase es la salida de colesterol desde las células periféricas al HDL que es su aceptor extracelular (6). En esta etapa participan proteínas transportadoras que permiten la salida de colesterol y fosfolípidos, siendo relevante ATP Binding Cassette, subfamilia A, miembro 1 (ABCA1) (7). La segunda fase del TRC se caracteriza por la remodelación y maduración de las HDL mediante la acción de enzimas y proteínas de transferencia lipídica presentes en el plasma (1,8). Por último, la tercera fase es la llegada del HDL al hígado y la liberación de los lípidos para su posterior ingreso a los hepatocitos, que se encargarán de la eliminación del colesterol (8,9). El TRC es un mecanismo que está finamente regulado en cada una de sus fases (8). Sin embargo, se desconoce si la presencia de

alteraciones del TRC en el músculo esquelético puede estar involucrado en el desarrollo de RI o viceversa (Figura A).

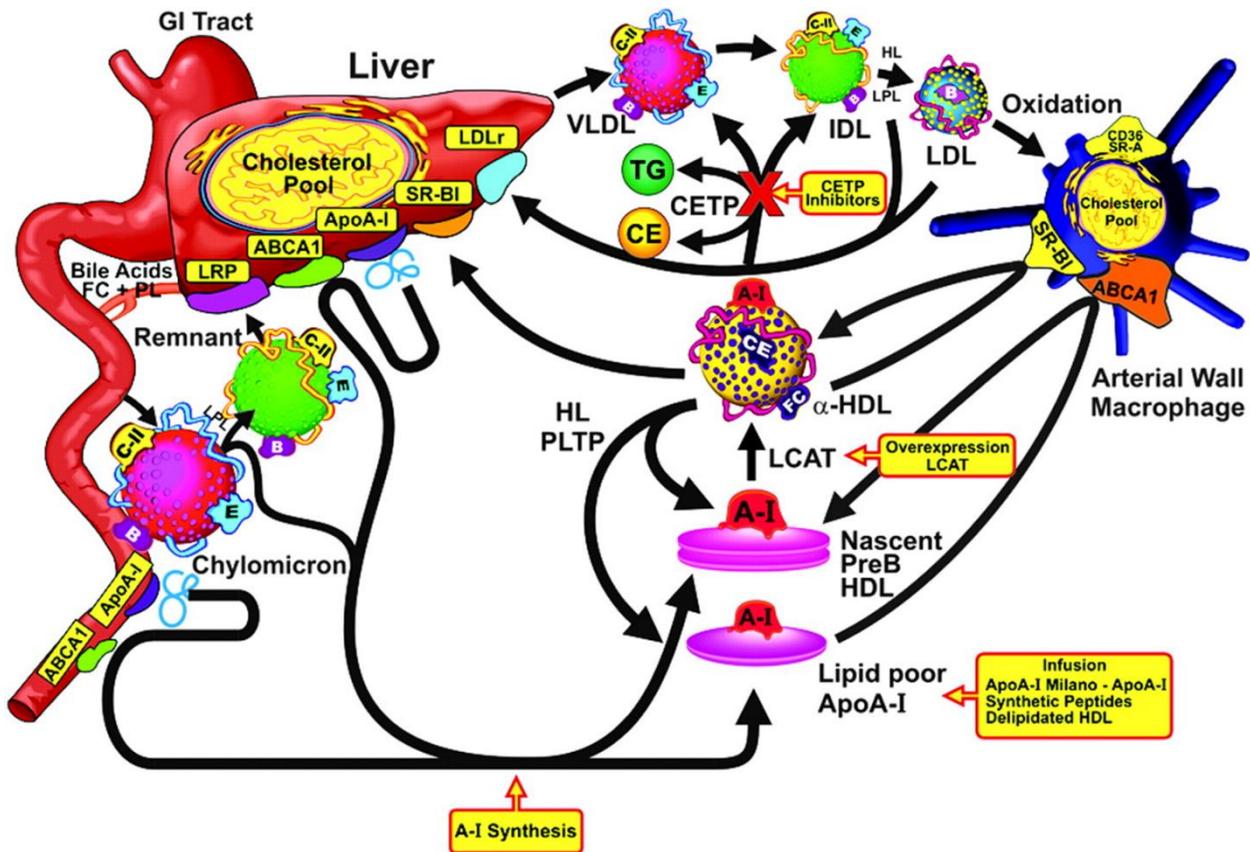


Figura A. Esquema del transporte reverso de colesterol. Extraído de Brewer y cols. 2004 (10).

La lipoproteína de alta densidad como principal aceptor plasmático de colesterol

La HDL es considerada un aceptor universal de colesterol desde todas las células de nuestro organismo, incluyendo el tejido canónico como el hígado (11,12). Esta macromolécula está constituida por un núcleo de lípidos hidrofóbicos rodeados por una "caparazón" de lípidos polares y proteínas (4). El 70% del componente proteínico de esta lipoproteína es principalmente la apoproteína A-1 (apoA-1) (6,8). La función de la apoA-1 es solubilizar el componente lipídico y ser blanco de diversas vías

de señalización (4). Los restantes componentes son otras apoproteínas, enzimas, proteínas de transferencia lipídica, proteínas de fase aguda, componentes del complemento, inhibidores de proteasas, fosfolípidos, esfingolípidos, triglicéridos, colesterol libre, ésteres de colesterol y ácidos grasos libres (6).

La formación del HDL tiene su inicio en el hígado e intestino delgado, los cuales secretan a la sangre las apoA-1 libres o pobres en lípidos (10% de colesterol libre y fosfolípidos). Las apoA-1 pueden fusionarse a HDL maduras o comenzar su propia maduración a HDL naciente o también conocido como HDL pre β . El HDL naciente es formado cuando la apoA-1 monomérica es expuesta a la célula cargada con colesterol, produciéndose un flujo neto de salida de colesterol (8). Existen 3 mecanismos que han sido descritos para la salida de colesterol desde la célula: difusión acuosa, mediado por *Scavenger Receptor B1* y mediado por proteínas de la familia ABC, siendo ABCA1 relevante en la primera fase del TRC (11).

ABCA1 y su importancia en el transporte reverso de colesterol

ABCA1 es una proteína ubicua formada por 2.261 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 240 kDa (13). Presenta 2 subunidades, cada una compuesta por 6 segmentos transmembrana que permiten la translocación de sustratos y presenta a su vez dos sitios de unión a nucleótidos (13–15). Esta proteína es dependiente de ATP y permite el transporte de salida unidireccional de colesterol libre y fosfolípidos desde las células hacia las apoA-1 y/o HDL pre β (16). El flujo de salida de colesterol dependiente de ABCA1 da cuenta de aproximadamente el 30% del contenido de colesterol plasmático en ratones (17). La alteración o mutación de este transportador genera una ausencia casi total de las HDL, como ocurre en la enfermedad de Tangier, patología que favorece la acumulación creciente de colesterol en las células e incrementa la formación de placas de ateroma (1,8). De manera interesante, estos pacientes además presentan una alteración en la función pancreática e intolerancia a la glucosa, sugiriendo que la ausencia o disminución de HDL plasmáticos estaría involucrada en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (18,19).

La primera etapa del TRC ha sido estudiada en diferentes modelos celulares (20–24). En fibroblastos se ha observado que un incremento del colesterol libre intracelular se asocia al aumento del ARNm de ABCA1 (20). La exposición de aceptores extracelulares de colesterol, como la apoA-1 o HDL pre β en cultivos de hepatocitos, fibroblastos y macrófagos aumenta la salida de colesterol por medio de este transportador (20,21). La expresión de ABCA1 también se ve alterada en condiciones de RI y DM2, disminuyendo su expresión en leucocitos y fibroblastos humanos, en la cual se observa una clara reducción de la salida de colesterol desde los fibroblastos de paciente diabéticos (22). O'Reilly y cols. (25) clasificaron una cohorte de 122 individuos basados en la secreción de insulina en respuesta a un test de tolerancia a la glucosa. Ellos observaron una reducción incremental del transporte de salida de colesterol dependiente de ABCA1 a mayor resistencia a la insulina. En adipocitos se ha observado que ratones *Knock-out* para ABCA1, una alimentación alta en grasas promueve aumentos en el contenido de colesterol y triglicéridos, produciendo una alteración en la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, además de modificar la expresión de genes involucrados en la homeostasis de colesterol y glucosa (26).

Los macrófagos de ratones *Knock-out* para caveolina 1 (*cav1*), proteína estructural de las caveolas, muestran una reducción en la expresión de ABCA1 y una respuesta alterada frente al aumento del colesterol intracelular (23). Chao y cols. (24), en base a los trabajos realizados en células endoteliales de ratas, sugieren una interacción directa entre ABCA1 y las HDL, como también entre ABCA1 y *cav1*, por lo que ABCA1 estaría mediando el flujo de salida de colesterol desde dominios ricos en colesterol hacia los aceptores extracelulares.

A pesar de los avances en esta área, no existe evidencia de que cambios en los niveles de expresión de ABCA1 en el músculo esquelético modifiquen la captación de glucosa mediada por GLUT4, favoreciendo el desarrollo de RI, objetivo central de esta tesis.

2. EL MUSCULO ESQUELETICO COMO GRAN CAPTADOR DE GLUCOSA

Debido a la constante actividad motora a la que se ve exigido el músculo esquelético, es imprescindible que exista una disponibilidad óptima de los sustratos energéticos y un metabolismo adecuado que permitan mantener un balance entre las demandas energéticas y la disponibilidad de éstas (27). El principal sustrato energético de la célula muscular son los carbohidratos y lípidos que extrae del plasma sanguíneo (28). Ambos nutrientes son almacenados como glucógeno o como gotas lipídicas dentro de la célula muscular (28–30). La utilización de estos sustratos dependerá del tipo de actividad al que se vea sometido y del tipo de fibra muscular (31), siendo uno de los tejidos que mayor glucosa extrae cuando aumenta la glicemia en la fase postprandial (9) o frente al aumento de la actividad motora (32). Bajo condiciones de euglicemia e hiperinsulinemia, alrededor del 80% de la captación de glucosa en humanos ocurre en el músculo esquelético, representando el principal componente de la homeostasis de la glucosa (9). En adultos no obesos, el músculo esquelético representa el 30 y 40% del peso corporal de mujeres y hombres, respectivamente (33). Pacientes con DM2 presentan defectos en el metabolismo de la glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético. Estas alteraciones han sido atribuidas a un alterado transporte de glucosa, resultando en un tráfico desregulado de GLUT4, la isoforma predominante del transportador de glucosa expresado en el músculo esquelético (34–36). Bajo estos antecedentes, cualquier alteración en la homeostasis de la glucosa a nivel muscular podría repercutir a niveles sistémicos. Así, estudios en el músculo esquelético y, más específicamente, en la fibra muscular podrían revelar nuevos mecanismos que determinan el desarrollo de la RI y la DM2.

Mecanismos descritos para el transporte de glucosa en el músculo esquelético

El músculo esquelético capta glucosa por medio de proteínas miembros de la familia de transportadores de glucosa (GLUT). La fibra muscular esquelética expresa el transportador de glucosa 1 y 4 en su membrana plasmática (37,38). Los GLUT1 permiten la captación de glucosa independiente del estímulo de insulina, dependiendo

de las gradientes de concentración de glucosa entre los compartimientos intra y extra celulares (39). Estos transportadores son endógenos en la membrana plasmática y presentan una abundancia relativamente baja, por lo que en reposo son los transportadores que captan glucosa (32). En contraste, GLUT4 es dependiente de diferentes estímulos relacionados con señalización hormonal y metabólica, estímulos que modifican la abundancia de este transportador en la membrana plasmática (32,40). La translocación de los GLUT4 puede ser dependiente o independiente de insulina, esta última por estímulo de la contracción muscular e hipoxia mediada por adenosina mono fosfato kinasa (AMPK) (41), proteína maestra en la regulación de la homeostasis celular energética y que participa en el transporte de glucosa en respuesta a estímulos independientes de la insulina (42).

Este trabajo de tesis, se enfoca en el transporte de glucosa mediado por GLUT4 dependiente de insulina. Como fue comentado anteriormente, el músculo esquelético es el principal tejido encargado de captar glucosa posterior al estímulo de la insulina (9,43,44). La unión de la insulina estimula la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor de insulina, resultando en la fosforilación en tirosina de sus sustratos citoplasmáticos 1 y 2 (IRS1 y IRS2, respectivamente) (45). El grado de fosforilación en serina/treonina de IRS1/IRS2 determina positiva o negativamente la transmisión de señales en respuesta a insulina (46). Una vez fosforilados IRS-1 e IRS-2 activan la enzima fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) (47). La activación de PI3K resulta en la fosforilación en serina 473 de la proteína kinasa B (PKB o Akt) (48). Esto estimula la translocación de GLUT4 desde vesículas intracelulares a la superficie celular. La fosforilación y aumento de la actividad de Akt favorece la síntesis de glucógeno y la formación de gotas lipídicas por estimulación de la glucógeno sintasa kinasa (49). Así, la señalización por insulina es un proceso finamente controlado que regula los niveles de glucosa plasmática. Una menor activación de esta vía conlleva a una serie de eventos que finalmente se traducen en un estado fisiopatológico de RI. Sin embargo, la gran mayoría de los estudios en esta área se han realizado en adipocitos y en miotubos, existiendo información escasa con respecto al proceso de transporte de glucosa en respuesta a insulina en el músculo esquelético adulto.

3. HIPOTESIS DE LOS MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN EL MUSCULO ESQUELETICO

La RI es un desorden metabólico complejo, que se caracteriza por una alteración en la capacidad que tienen las células de captar glucosa posterior al estímulo de la insulina (50). Se considera como un estado previo al desarrollo de la DM2, en conjunto con otros trastornos metabólicos que conforman el síndrome metabólico (51). Se han propuestos variados mecanismos que subyacen a la RI, entre ellos fosforilaciones de IRS1/2 en serina y treonina, activación de vías proinflamatorias, acumulación de diacilglicerol y ceramidas, acumulación de aminoácidos y estimulación de la vía mTOR y/o aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (51–53). El estrés de retículo endoplásmico es otro de los mecanismos descritos asociado a estados de lipotoxicidad e inflamación crónica, favoreciendo la acumulación de intermediarios lipídicos lo que altera la señalización de la insulina (50,54,55). La modificación de la composición lipídica de la membrana plasmática también puede afectar la translocación de GLUT4 y la señalización de insulina (56,57). Todos estos mecanismos se asocian a estados nutricionales alterados, como el sobrepeso y la obesidad debido a una alimentación alta en grasas y carbohidratos, sobrecargando la maquinaria metabólica celular. A pesar de la naturaleza multifactorial de la RI, aún no está descrito la importancia relativa de cada uno de estos mecanismos y como interaccionan entre sí en el desarrollo de esta condición en el músculo esquelético adulto.

Colesterol de membrana y su papel en la captación de glucosa en fibras musculares

Los cambios en la composición lipídica pueden alterar la captación de glucosa mediada por insulina, lo que se explicaría, en parte, por cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana plasmática (56–58). La proporción de fosfolípidos poli-insaturados y/o la cantidad de colesterol son factores que modifican la fluidez de la membrana (59). Llanos y cols. (56) demostraron que en ratones obesos con RI existe

un aumento de los niveles de colesterol en los TT del músculo esquelético adulto. Los TT son invaginaciones de la membrana plasmática (sarcolema) que representan el 80% de la membrana plasmática de la fibra muscular (60). Este aumento de colesterol disminuye la fluidez de las membranas e interactúa con las proteínas de membrana afectando tanto su función como su estructura (61), factores que podrían alterar la captación de glucosa mediado por GLUT4. Los ratones utilizados en este trabajo fueron alimentados con una dieta alta en grasas (HFD, *High Fat Diet*, de sus siglas en inglés) durante 8 semanas, periodo en el cual desarrollaron RI, evaluada por un test de tolerancia a la glucosa e insulinemia alterados. A nivel celular, la captación de glucosa fue disminuida en fibras musculares aisladas. Posteriormente, se expuso a las células musculares de los ratones HFD a metil β ciclodextrina (MβCD), un agente que retira colesterol de las membranas plasmáticas, intervención que logró revertir todos los parámetros alterados, presentando un comportamiento similar a los ratones con dieta control (NCD, *Normal Chow Diet*, de sus siglas en inglés). Esto sugiere que, al modificar las concentraciones de colesterol en la membrana de las fibras musculares, la captación de glucosa también se ve modificada. Una mayor cantidad de colesterol disminuye la fluidez de la membrana y también la captación de glucosa, debido a una menor translocación de GLUT4 al sarcolema y TT. De manera interesante, las HDL asociadas a flujo de salida de colesterol mediado por ABCA1, cumplen una función similar a la realizada por MβCD, favoreciendo la remoción de colesterol y aumentando la fluidez de la membrana, observado principalmente en macrófagos y leucocitos (62)

En conjunto, los antecedentes descritos nos sugieren las siguientes preguntas:

¿Cambios en la expresión de ABCA1 modificarán el contenido de colesterol de la membrana plasmática de las fibras musculares de ratón?

¿Juega ABCA1 un papel fundamental en la captación de glucosa en el músculo esquelético?

¿Existe una asociación entre los niveles de expresión de ABCA1 y la activación de la vía de señalización dependiente de insulina?

Responder estas preguntas nos permitirá establecer el papel de ABCA1 en el contenido de colesterol y en el transporte de glucosa dependiente de insulina en fibras musculares de ratones adultos. Además, nos ayudará a definir si cambios en la función/expresión de esta proteína por una dieta alta en grasas participa como un nuevo mecanismo en el desarrollo de RI en el músculo esquelético.

HIPOTESIS

“La disminución de la expresión de ABCA1 incrementa el contenido de colesterol, reduce los niveles de Akt fosforilado y el transporte de glucosa en fibras musculares de ratón”.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de ABCA1 en la regulación del contenido de colesterol de membrana, la fosforilación de Akt y la captación de glucosa mediada por GLUT4 en el músculo esquelético de ratones adultos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Para explorar nuestra hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos específicos y racional:

- 1- Evaluar los niveles del ARNm de ABCA1, la abundancia de la proteína y su localización en fibras musculares de ratones normales comparados con ratones obesos insulino-resistentes.**

Racional: Basado en trabajos previos (56), existe una relación inversa entre el colesterol presente en la membrana celular y la sensibilidad a la insulina del músculo esquelético de ratones adultos. Los ratones alimentados con una dieta alta en grasas presentan mayor colesterol en la membrana y desarrollan resistencia a la insulina. ABCA1 es el principal transportador de colesterol de la membrana, por lo que se esperaría que esté presente en la membrana plasmática de las fibras musculares y que en ratones HFD este transportador este alterado en relación a su localización, expresión y/o función. Para evaluar este objetivo, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para establecer la localización de ABCA1 en condiciones de dieta normal y bajo la exposición de 8 semanas de HFD. Además, se realizaron mediciones del ARNm y de la abundancia de la proteína ABCA1 en animales alimentados con NCD y en aquellos alimentados con HFD durante 8 semanas.

- 2- Determinar el contenido de colesterol de las fibras musculares de ratones *knock-down* para ABCA1 y compararlas con ratones HFD.**

Racional: Para establecer si la modificación de la expresión de ABCA1 modifica el contenido de colesterol, se generó un modelo *knock-down* (KD) para ABCA1

a través de la electroporación de un *shABCA1*-RFP en el FDB derecho y *scrambled*-RFP en el FDB izquierdo del ratón alimentado con una dieta control. Para establecer el modelo, cuantificamos la disminución del ARNm y la proteína para ABCA1. Una vez establecido el modelo medimos las concentraciones de colesterol en los FDB electroporados con el *shABCA1*-RFP comparados con los electroporados con el *scrambled*-RFP (control). Para llevar a cabo estas mediciones, realizamos marcaje con filipina III, y este ensayo visualizado a través de microscopia de epifluorescencia.

3- Evaluar la vía de señalización dependiente de insulina en ratones *knock-down* para ABCA1.

Racional: A través de este objetivo evaluamos si ABCA1 tiene un papel en el control de la captación de glucosa mediada por GLUT4. Cuantificamos en presencia de insulina la fosforilación de Akt en el residuo S473, a través de ensayos Western blot de FDB de los ratones electroporados con el plasmidio *shABCA1*-RFP. Como control de estos experimentos, se utilizaron los FDB de ratones electroporados con plasmidio *scrambled*-RFP. De esta manera se obtuvieron resultados del efecto de la disminución de ABCA1 sobre la vía de señalización dependiente de insulina.

4- Evaluar el transporte de glucosa en fibras musculares de ratones *knock-down* para ABCA1.

Racional: Los experimentos que abordamos en este objetivo nos permitieron evaluar el papel de ABCA1 en el transporte de glucosa mediado por GLUT4. Para ello, determinamos la captación del análogo fluorescente de deoxiglucosa 2-NBDG en fibras musculares aisladas desde animales electroporados con el *shABCA1*-RFP comparados con ratones electroporados con el plasmidio *scrambled*-RFP.

La figura B esquematiza los 4 objetivos específicos:

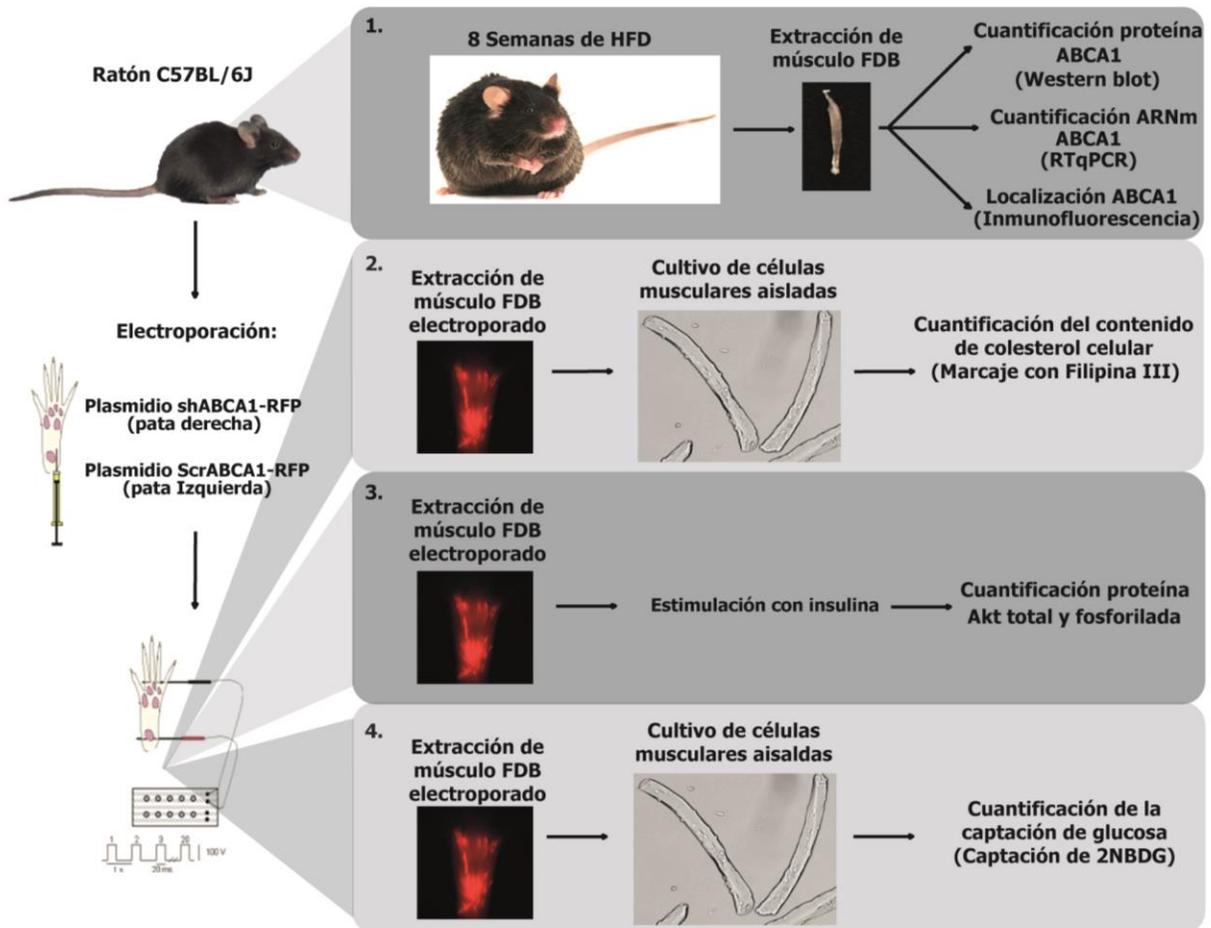


Figura B. Esquema experimental en base a los objetivos específicos propuestos

MATERIALES Y METODOS

Reactivos. Los reactivos que se utilizaron durante el desarrollo de este trabajo fueron proporcionados por el Laboratorio de la Dra. Paola Llanos (Laboratorio de Mecanismos Celulares de Enfermedades Crónicas; con financiamiento aportado por el Proyecto FONDECYT de Iniciación 11150243, CONICYT-CHILE) y el Laboratorio del Dr. Enrique Jaimovich (Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo). Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico.

Animales. En este estudio se utilizaron ratones machos C57BL/6J de 21 días destetados y alimentados exclusivamente por 8 semanas con dieta control (NCD - 10% grasas, 20% proteínas, y 70% carbohidratos; D12450, Research diets, NJ, USA) o con dieta alta en grasas (HFD - 60% grasas, 20% proteínas, y 20% carbohidratos; D12492, Research diets, NJ, USA, ver en anexo), obtenidos desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Los roedores fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas, según el protocolo de bioética #0822, asociado al proyecto FONDECYT de iniciación N° 11150243.

Cultivo de fibra muscular. Fibras musculares adultas aisladas desde el *Flexor Digitorum Brevis* (FDB) electroporado con *shABCA1-RFP* o *scrambled-RFP* se obtuvieron por digestión enzimática del músculo completo como ha sido reportado por Casas y cols (63). Brevemente, el músculo completo fue disecado e incubado con 450-500 unidades/mL de colagenasa tipo II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) por 90 min a 37°C. Posteriormente el músculo fue disociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes diámetros hasta obtener fibras únicas. Las fibras aisladas fueron sembradas sobre cubreobjetos pre-tratados con gel ECM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, 10% suero de caballo y 1% penicilina/estreptomicina) y mantenidas a 37 °C y 5% CO₂ hasta su uso.

Preparación, amplificación y purificación del ADN plasmidial. Transformación de bacterias: Bacterias *E. coli* cepa DH5 α quimiocompetentes (25 μ L D.O. 0,6-0,8 nm) se transformaron en presencia de 0,1 μ g del plásmido de interés. A esta mezcla se le agregó 1 ml de medio de transformación SOC, Triptona 20%, extracto de levaduras

5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, Mg 2 M, Glucosa 2 M y se incubaron a 4° C por 30 min, seguido de un golpe térmico a 42°C por 45 segundos. Luego se incubaron por 45 min a 37°C. Posteriormente 100 µL de la suspensión de bacterias se sembraron y aislaron sobre una placa con agar al 1,5% de medio SOB, Triptona 20%, Extracto de levadura 5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, que contiene ampicilina 50 µg/mL, como antibiótico de selección, toda la noche a 37°C. Después, se seleccionaron las bacterias que completaron exitosamente la transformación y que formaron colonias aisladas, para ser expandidas en medio antes descrito suplementado con ampicilina para luego ser congeladas a -80°C en DMSO 7%.

La amplificación de plasmidios se realizó en 100 ml de medio SOB con ampicilina (50 µg/mL) se inocularon con bacterias almacenadas en DMSO y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación (180 rpm). Posteriormente las bacterias se centrifugaron a 2400 xg por 15 minutos a 4°C. La purificación del ADN plasmidial se llevó a cabo mediante el kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit, (Qiagen, Hilden, Alemania). La determinación de la concentración de cada plasmidio se realizó a través de la determinación de su absorbancia 260/280 nm. La calidad del ADN plasmidial se evaluó en un gel de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio y se comparó con el estándar 1 Kb DNA Mass Ladder.

Electroporación *in-vivo* de músculo FDB. La transfección de los plasmidios en los músculos FDB de los ratones adultos se realizó como se ha descrito previamente (64). Brevemente, animales alimentados con NCD fueron anestesiados usando 5% isoflurano e inyectados en la planta de la pata trasera con 2 mg/ml de hialuronidasa tipo IV (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Una hora después, 20 µg de ADNc fueron inyectados en el mismo lugar. Posteriormente, a través de electrodos orientados paralelos entre sí y perpendiculares al eje longitudinal del pie, se aplicó 20 pulsos de 100 V y 20 ms de duración a 1 Hz utilizando un estimulador de pulsos GRASS S48 (Grass Medical Instruments, Quincy, MA, USA). Una vez transcurridos 10 días después de la electroporación los animales fueron sacrificados y se extrajeron los músculos FDB de ambas patas según protocolo presentado anteriormente. Las secuencias utilizadas presentes en los plasmidios fueron las siguientes:

5'-CATTCCGACAGAAGTCAGGCTCATCAACA-3' - *shABCA1*-RFP.

(Origene, Rockville, MD, USA)

5'-GCACTACCAGAGCTAACTCAGATAGTACT-3' - *scrambledABCA1*-RFP.

(Origene, Rockville, MD, USA)

Determinación de los cambios de expresión génica para ABCA1. Los músculos FDB aislados desde animales NCD o HFD fueron extraídos y colocados en TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. A través de qPCR se analizaron los niveles de expresión de ABCA1 en músculos aislados de ratones alimentados con NCD y HFD. Los partidores (Tabla1) y los protocolos de qPCR fueron utilizados como previamente ha sido reportado (65,66). El ADNc proveniente de los ratones alimentados con NCD y HFD fue preparado mediante transcripción reversa de 1µg de RNA total, usando SuperScript II de acuerdo con el protocolo de fabricación. El PCR en tiempo real se realizó usando *Platinum Taq DNA polymerase* y *SYBR® Green Nucleic A* (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA), entre otros reactivos, utilizando el termociclador Stratagene, Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Como control se amplificó el gen *housekeeping* GAPDH. La cuantificación del ARNm está expresada en el orden de los nanogramos.

Nombre Partidor	Secuencia
ABCA1 sentido	5'-GCTCTCAGGTGGGATGCAG-3'
ABCA1 antisentido	5'-GGCTCGTCCAGAATGACAAC-3'
GAPDH sentido	5'-CAACTTTGGCATCGTGGAAG-3'
GAPDH antisentido	5'-CTGCTTCACCACCTTCTT-3'

Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados.

Electroforesis y análisis de Western blot. Los músculos fueron extraídos desde animales electroporados con *shABCA1*-RFP o *scrambled*-RFP y lisados con tampón RIPA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) suplementado con inhibidores de proteasas (Basilea, Suiza) e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Posteriormente, se homogenizó manualmente y fue sonicado por 2 min a 4°C. El lisado fue mantenido en hielo por 10 min y centrifugado a 1500 xg por 20 min a 4°C. El *pellet* fue descartado y el sobrenadante congelado y mantenido a -80 °C hasta su utilización. Las proteínas fueron cuantificadas a través del método del ácido sulfosalicílico (67). La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo por métodos estándares. Brevemente, 30 µg totales de proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE), en un gel de gradiente discontinua de 4/12% para ABCA1 y GAPDH, y en gel convencional 10% para Akt fosforilada y total. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Los anticuerpos primarios fueron diluidos 1:1000 en solución de bloqueo e incubados a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-ABCA1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-Akt (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-fosfo-Akt (Ser473, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) y GAPDH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posterior al lavado, las membranas fueron incubadas por una hora con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo (1:5000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La detección se realizó por quimioluminiscencia por métodos estándares.

Inmunocitoquímica para ABCA1. Los cultivos de fibras de los músculos extraídos desde animales alimentados con NCD o HFD fueron fijados usando 4% paraformaldehído fresco (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) por 15 min. Posterior al lavado con tampón fosfato salino (PBS), las células fueron permeabilizadas con 1% Triton X-100 por unos minutos. Luego del bloqueo con 3% Albúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 1 h las fibras fueron incubadas con anti-ABCA1 (1:500, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) a 4°C durante toda la noche. Tras los lavados, se incubaron las muestras con Alexa Fluor 488 anti-conejo IgG (1:400, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), durante 1 h a temperatura ambiente. Para preservar la fluorescencia, las fibras fueron incluidas en medio de montaje Dako (Dako, Carpinteria, CA, USA). Como controles negativos para cada experimento, se realizaron citoquímica sin anticuerpo primario para determinar el nivel de señal inespecífica. Las imágenes fueron obtenidas por microscopia confocal (Microscopio invertido. LSM 5 Pascal, Zeiss, Alemania) y la adquisición se realizó con

el programa LSM 5 (Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron almacenadas digitalmente hasta su posterior análisis con el programa Image-J (National Institutes of Health, USA).

Determinación del contenido de colesterol en la membrana plasmática. El contenido de colesterol en la membrana se realizó por medio de la tinción con filipina III (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Brevemente, las fibras *shABCA1-RFP* o *scrambled-RFP* en cultivo fueron fijadas con 3% paraformaldehído fresco (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA). 0,05 mg/ml filipina III en PBS/10% FBS fue incubado por 2 h a temperatura ambiente. Posterior al lavado, las fibras fueron visualizadas a través de un microscopio de epifluorescencia (Spinning disk IX81, Olympus, Tokio, Japón). Las imágenes fueron almacenadas digitalmente hasta su posterior análisis con el programa Image-J (NIH, Bethesda, MD, USA). Las fibras musculares en cultivo fueron analizadas como se ha descrito previamente (56,68).

Captación de glucosa en fibras musculares aisladas.

Cultivos de fibras musculares adultas aisladas desde animales electroporados con *shABCA1-RFP* o *scrambled-RFP* fueron lavadas con tampón *Krebs-Ringer* y estimuladas con 100 nM insulina. Las fibras fueron expuestas con el análogo fluorescente de glucosa a 300 μ M de 2-(N-(7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucosa (2-NBDG, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente, las fibras en cultivo fueron lavadas y la captura de 2-NBDG fue visualizada a través de microscopia confocal (LSM 5 Pascal, Zeiss, Alemania). Las muestras fueron excitadas a 488 nm y la fluorescencia fue capturada en un espectro de 505-550 nm. Alrededor de 100 células por cultivo fueron analizadas y las imágenes fueron almacenadas digitalmente hasta su posterior análisis con el programa Image-J (NIH, Bethesda, MD, USA).

Consideraciones Bioéticas y de Bioseguridad. Los animales se utilizaron de acuerdo al protocolo de uso y cuidado de animales #0822 aprobado por la Comisión de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Este trabajo de tesis cumple con los requerimientos básicos de

bioseguridad para ser desarrollado, y se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT Bioseguridad primera edición, 1994, Manual de Normas de Bioseguridad, segunda edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, cuarta edición y el Manual de Bioseguridad en Laboratorios, Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005.

Análisis Estadístico. Los resultados de los experimentos fueron expresados como valor promedio \pm error estándar (ES). Para establecer la significancia de las diferencias observadas en los promedios se analizó la distribución Gaussiana normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk y la igualdad de varianzas a través de la prueba de Levene. Para los datos de distribución normal y varianzas iguales, se utilizó la prueba de T-Student para datos pareados y ANOVA de una vía seguido de pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett o Tukey. Para aquellos datos de distribución no normal se utilizó el test de U Mann-Whitney para datos pareados y el test de Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Un $P < 0,05$ fue considerado para la significancia estadística y el análisis de los datos y la construcción de gráficos se utilizó el programa computacional GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

RESULTADOS

Disminución de la expresión de ABCA1 en el músculo esquelético de ratones insulino resistentes.

Para establecer si la condición de insulino-resistencia inducida por dieta modifica el contenido de ABCA1 en la fibra muscular de ratón, se realizaron ensayos de qPCR y Western blot para ABCA1 en el FDB de ratones alimentados con HFD por 8 semanas. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en ratones alimentados con dieta NCD. Además, se analizó la localización de ABCA1 en fibras aisladas de músculos FDB de animales alimentados con HFD comparados con animales alimentados con NCD.

Análisis de qPCR. Como se observa en la figura 1, el análisis de qPCR muestra una disminución de los niveles relativos de ARNm para ABCA1 en los animales HFD comparados con los animales NCD en el músculo FDB. Los animales HFD alcanzaron valores de $0,51 \pm 0,09$ y los animales NCD valores $1,02 \pm 0,03$ veces. Con la finalidad de evaluar el efecto agudo de la exposición a HFD, nosotros medimos los niveles del transcrito de ABCA1 en el FDB de animales de 8 semanas de edad alimentados durante 1 semana con la dieta HFD. Como se muestra en la figura 1, los animales alimentados con HDF durante 1 semana, mostraron un aumento en el ARNm para ABCA1 ($3,21 \pm 0,47$ veces) comparados con los animales controles ($1,03 \pm 0,02$ veces). En conjunto, estos resultados sugieren una regulación diferencial del ARNm de ABCA1 en el músculo esquelético de animales alimentados con HFD por 1 ó 8 semanas, sugiriendo una posible respuesta adaptativa para restaurar los niveles de colesterol excesivos a la semana de exposición a la dieta, respuesta que se pierde a las 8 semanas de HFD.

Contenido de ABCA1. Con el objetivo de evaluar la abundancia de ABCA1 en los animales HFD nosotros llevamos a cabo experimentos de Western blot de homogeneizados de FDB. Una banda inmunoreactiva fue detectada sobre 250 KDa, similar a la observada en la corteza cerebral o en hígado de ratón, ambos utilizados como control positivo. El peso esperado para ABCA1 es de 254 KDa. Los niveles de ABCA1 disminuyen significativamente en los animales HFD comparados con los NCD,

alcanzando valores de $0,39 \pm 0,10$ y $1,02 \pm 0,02$ veces, respectivamente (Fig. 2). Estos datos sugieren que la condición de RI promueve una disminución en el contenido de ABCA1 en el músculo esquelético de ratón adulto.

Localización de ABCA1. Para determinar la localización de ABCA1 en el músculo esquelético, nosotros evaluamos la localización de ABCA1 en fibras únicas aisladas desde el músculo FDB de animales alimentados con NCD y HFD. ABCA1 disminuye su contenido proteico en ambos músculos de animales HFD comparados con los NCD (Fig. 3), presentando una clara localización estriada.

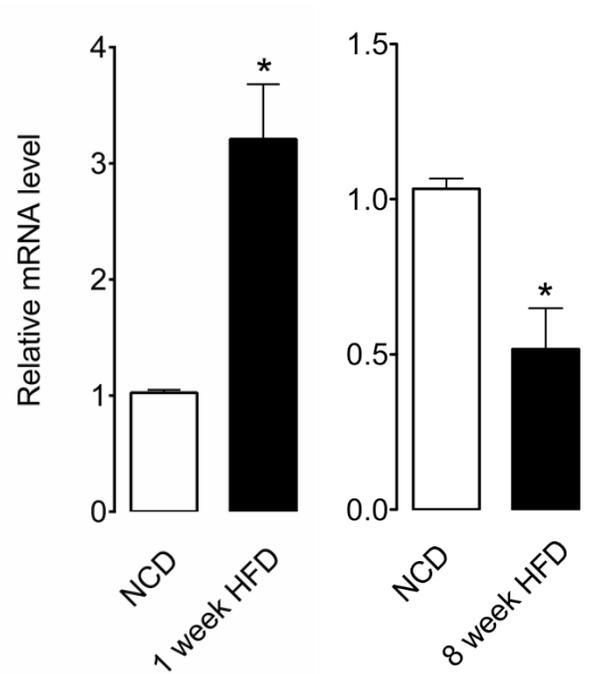


Figura 1. Los niveles relativos de ARNm de ABCA1 fueron determinados por *RT-qPCR* en músculos de animales alimentados con NCD y HFD por 1 semana y 8 semanas. Los niveles relativos de ARNm fueron normalizados con GAPDH. * $p < 0.05$, determinado mediante análisis con la prueba de U Mann Whitney de 4 determinaciones independientes ($n = 4$).

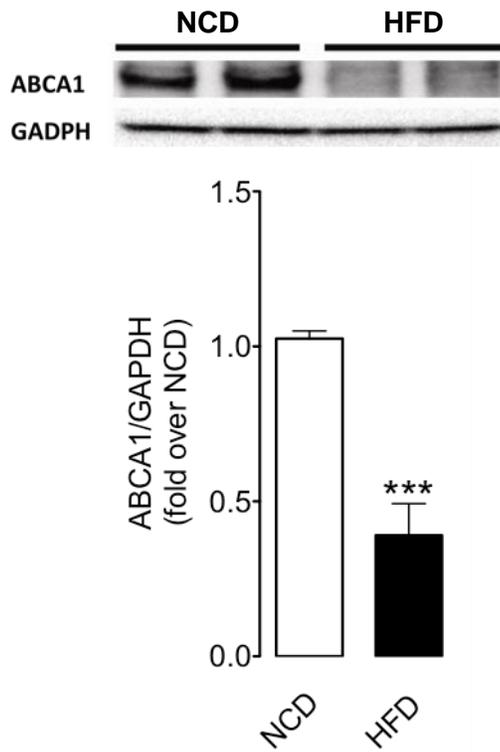


Figura 2. Western blot representativo y cuantificación de ABCA1 de homogeneizados preparados desde el FDB de animales NCD o HFD. GADPH fue medida como control de carga. 40 μ g por carril. *** $p < 0.001$ determinado mediante análisis con la prueba de U Mann Whitney de 4 determinaciones independientes ($n = 4$).

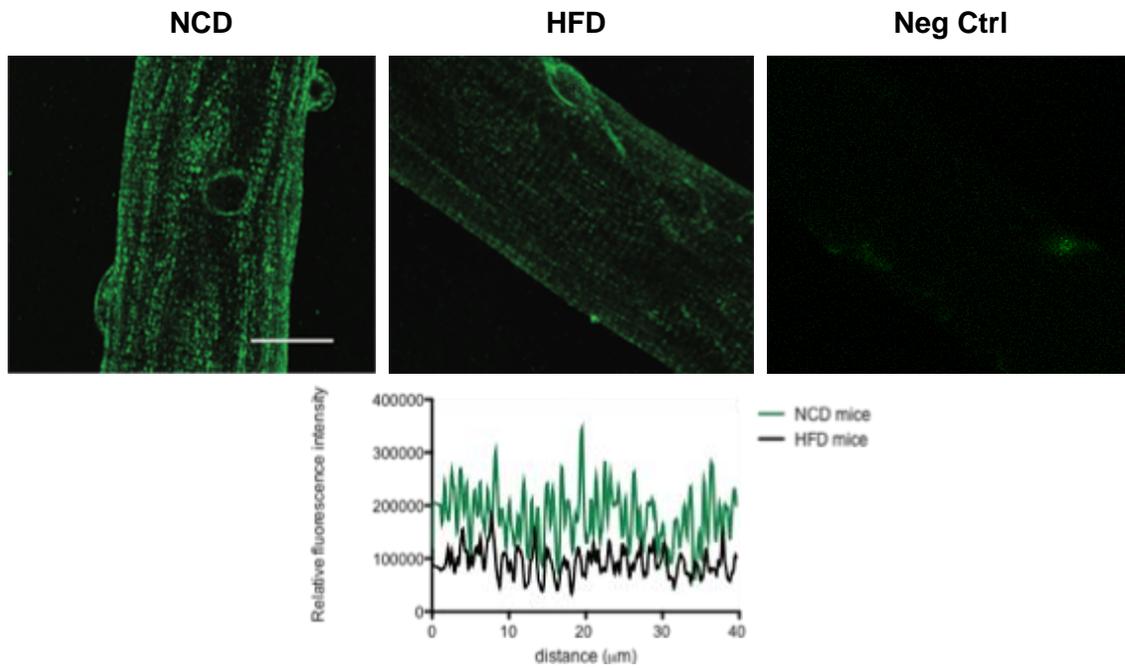


Figura 3. Imagen confocal representativa en proyección z de fibras adultas desde NCD, HFD. En el control negativo (Neg Ctrl) se omitió el anticuerpo primario. La barra indica 10 μm . Panel inferior: cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa en fibras de animales alimentados con NCD (verde) y HFD (negro) ($n = 4$).

shABCA1 disminuye el contenido de ABCA1 en el FDB.

Como se comentó arriba, el contenido de ABCA1 se encuentra disminuido en los ratones HFD (Fig. 2). Con la finalidad de emular esta condición, nosotros electroporamos un plasmidio que codifica para *shABCA1-RFP* en animales NCD a través de electroporación *in-vivo* del músculo FDB (Fig. 4A). Como se muestra en la figura 4, ABCA1 disminuye en un 70% posterior a 10 días de la electroporación en homogeinizados de FDB (Fig. 4B). Este resultado fue corroborado a través de imágenes confocales en fibras únicas aisladas desde el FDB electroporado (Fig. 4C).

ABCA1 regula el contenido de colesterol de la membrana en las fibras del músculo esquelético.

Para evaluar el efecto de la disminución del ABCA1 en el contenido de colesterol de la célula muscular, se llevaron a cabo experimentos con la tinción con filipina III en fibras aisladas desde el FDB de animales electroporados con los plasmidios *scrambled-RFP* o *shABCA1-RFP*. El análisis de la fluorescencia en las fibras *shABCA1-RFP* muestra un aumento significativo del contenido de colesterol comparados con las fibras *scrambled-RFP*, alcanzando valores de $1,53 \pm 0,14$ y $1,05 \pm 0,10$ veces, respectivamente (Fig. 5). De manera interesante, la fluorescencia de la filipina III no mostró cambios significativos en las fibras *scrambled-RFP* comparadas con las fibras controles, estas últimas son aquellas que no fueron electroporadas.

shABCA1 disminuye la fosforilación de Akt por insulina.

Insulina promueve una vía de transducción de señales que genera la fosforilación de Akt en el residuo de serina 473 (S473) para la translocación de GLUT4 en el músculo esquelético. Con la finalidad de evaluar la fosforilación de este residuo, nosotros llevamos a cabo experimentos de Western blot en el músculo FDB de animales electroporados con *shABCA1-RFP* y *scrambled-RFP*. Como se muestra en la figura 6, la electroporación de *shABCA1-RFP* disminuye aproximadamente en

un 72% la fosforilación del residuo de S473 en presencia de insulina. Estos resultados sugieren que la disminución de ABCA1 afecta la fosforilación de Akt, lo cual podría tener un efecto en la translocación de GLUT4 y con ello en la disminución de la captación de glucosa.

La presencia de ABCA1 es requerida para el transporte de glucosa mediado por GLUT4 en fibras musculares aisladas.

Con la finalidad de evaluar el papel de ABCA1 en la captación de glucosa mediada por GLUT4, se midió la captación de 2-NBDG, un análogo fluorescente de glucosa, en las fibras musculares aisladas desde el FDB de animales electroporados con los plasmidios *scrambled*-RFP o *shABCA1*-RFP. Como se muestra en la figura 7, 100 nM de insulina promueve un aumento de la fluorescencia ($2,17 \pm 0,26$ veces) en las fibras electroparadas con *scrambled*-RFP comparadas con las fibras *scrambled*-RFP en condiciones basales ($1,00 \pm 0,08$ veces). En contraste, este aumento no fue observado en las fibras *shABCA1*-RFP en presencia de insulina y los valores fueron similares a la condición basal en las fibras *shABCA1*-RFP, $1,17 \pm 0,15$ y $1,29 \pm 0,12$ veces, respectivamente. Estos resultados sugieren que ABCA1 es requerido para el transporte de glucosa en fibras musculares aisladas.

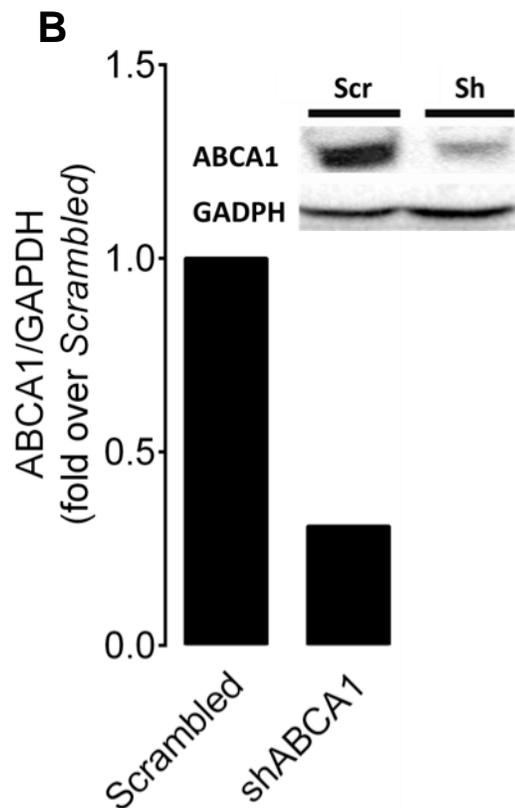
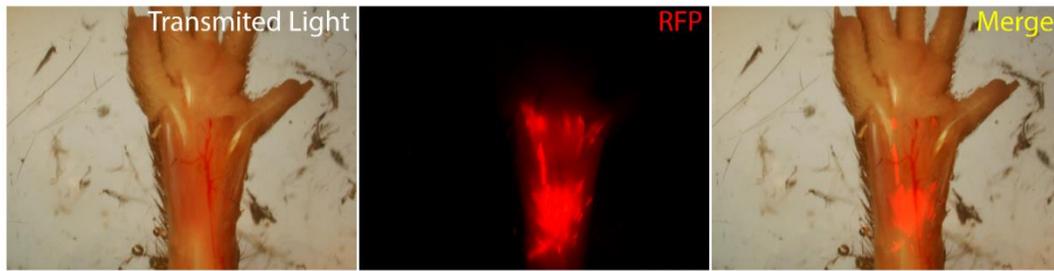
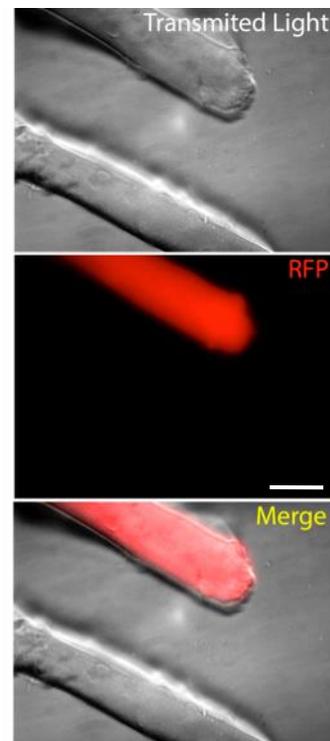
A**C**

Figura 4. (A) Imágenes de epifluorescencia del músculo FDB electroporado con *shABCA1*-RFP. Imagen de luz transmitida (panel izquierdo), imagen fluorescente de RFP (panel central). La sobreposición de ambas imágenes se muestra en el panel derecho. (B) Western blot representativo y cuantificación de ABCA1 en homogeneizados preparados a partir del músculo FDB de ratones electroporados con plasmidios *shABCA1*-RFP o scrambled-RFP de 2 experimentos independientes ($n = 2$). 30 μg por carril. Scr: *scrambled*; Sh: *shABCA1*. (C). Imágenes de epifluorescencia en fibras aisladas desde FDB electroporados con *shABCA1*-RFP. Imagen de luz transmitida (panel superior), imagen fluorescente de RFP (panel central). La sobreposición de ambas imágenes se muestra en el panel inferior. La barra indica 30 μm .

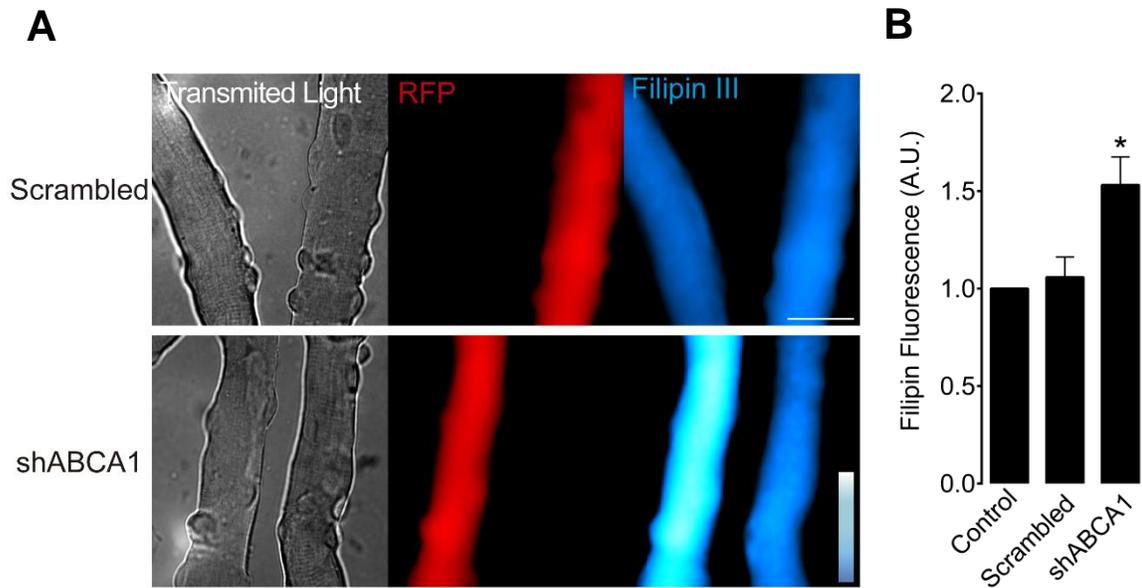


Figura 5. (A) Imágenes representativas de epifluorescencia de fibras musculares aisladas desde el músculo FDB con los vectores plasmidiales *shRNA* ABCA1-RFP y *scrambled*-RFP (paneles centrales) y tinción con filipina III (paneles derechos). (B) Cuantificación de la fluorescencia relativa de filipina III en el control y las fibras electroporadas. Valores promedio \pm ES. * $P < 0,05$ vs. control, determinada por el test de Kruskal-Wallis seguido del post test de Dunn de 3 determinaciones independientes ($n = 3$). La barra indica $40 \mu\text{m}$.

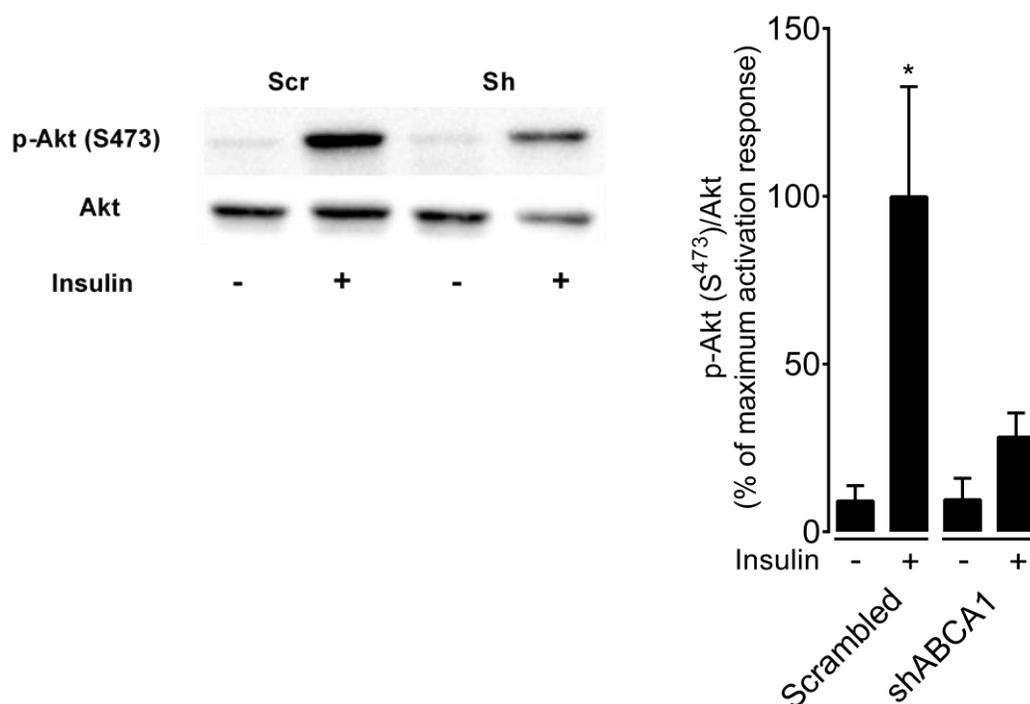


Figura 6. Western blot representativo y cuantificación de pAkt (S473) y Akt total en homogeneizado de músculo FDB electroporados con shABCA1-RFP o *scrambled*-RFP en condiciones basales o estimulados con 100 nM insulina. Después de aproximadamente 10 días de electroporación *in vivo*, los músculos fueron aislados y homogeneizados tras la incubación en condiciones basales o estimulados con insulina. Valores promedio \pm ES. * $P < 0,05$ vs. condición basal, determinada por el test de Kruskal-Wallis seguido del post test de Dunn de 4 determinaciones independientes ($n = 4$). Scr: *scrambled*; Sh: *shABCA1*.

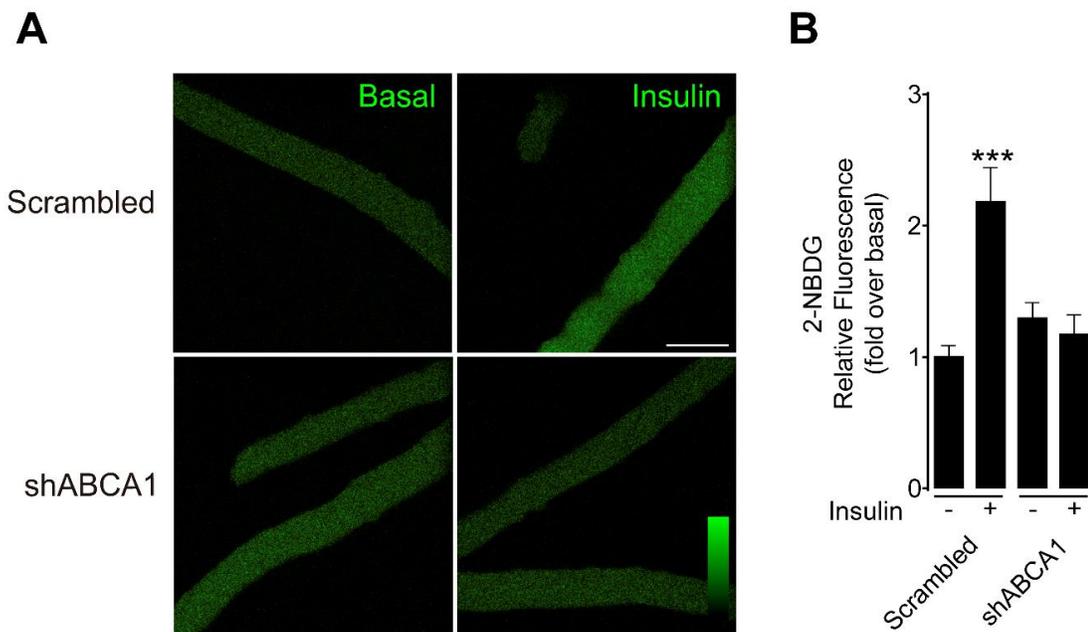


Figura 7. Las fibras musculares aisladas fueron cargadas con $300 \mu\text{M}$ de 2-NBDG por 15 minutos y preincubadas por 20 minutos con 100 nM de insulina. **(A)** Imágenes confocales representativas de fibras musculares aisladas electroporadas con plasmidios *scrambled*-RFP y *shARN* ABCA1-RFP cargadas con 2-NBDG en condición basal y en presencia de insulina. **(B)** Efecto de 100 nM de insulina sobre la captación de 2-NBDG en fibras electroporadas con plasmidios *scrambled*-RFP y *shARN* ABCA1-RFP. Valores promedio \pm ES. *** $P < 0,001$ vs. condición basal, determinado por ANOVA de una vía, seguido del test post-hoc de Tukey de 4 determinaciones independientes ($n = 4$). La barra indica $40 \mu\text{m}$.

DISCUSSION

El objetivo central de este trabajo fue evaluar el efecto de la disminución de la expresión de ABCA1, una proteína clave en la homeostasis del colesterol que participa en las fases iniciales del TRC, sobre el transporte de glucosa dependiente de insulina en fibras musculares esqueléticas adultas.

La exposición a una dieta alta en grasas tiene diversos efectos sobre el metabolismo celular, sobrecargando la maquinaria metabólica y alterando la homeostasis de lípidos y carbohidratos, factores relacionados con la RI (69). Nuestros resultados muestran que la exposición de 8 semanas a una dieta alta en grasas tiene un efecto represor de la expresión del ARNm y de la proteína de ABCA1 en las fibras musculares (Fig. 1). Estos datos son similares a los descritos por Miso y cols. (70), quienes observaron una disminución significativa de la proteína ABCA1 en el hígado tras la exposición de 6 semanas de una dieta alta en grasas. De manera interesante, en su trabajo se observaron dos fenotipos marcados, un grupo de ratones resistentes a la obesidad y otro grupo propenso a la obesidad. Este último grupo se caracterizó por una pronunciada ganancia de peso corporal que correlacionaba con una disminución importante de la expresión de ABCA1. En contraste con lo anterior, los ratones resistentes a la obesidad presentaron una menor ganancia de peso sin cambios en la expresión de ABCA1. Es importante señalar que nosotros también observamos la presencia de estos fenotipos, lo que podría llevar a subestimar la disminución de ABCA1 por exposición a una dieta alta en grasas (datos no mostrados). Por otro lado, Singaraja y cols. (71) describieron un aumento del ARNm de ABCA1 en diversos tejidos (cerebro, corazón, hígado y macrófagos) posterior a la exposición a una semana de dieta alta en grasas. Una respuesta similar hemos encontrado al mismo tiempo de exposición en nuestros experimentos (Fig. 1, izquierda). Pacientes con Diabetes tipo 1 (DM1) también muestran una disminución de la expresión de ABCA1 y un aumento en el contenido de colesterol en podocitos, aumentando la apoptosis celular y la pérdida de fosforilación de caveolina (72). Mizuno y cols. (73) encontraron mayor ubiquitinación y degradación lisosomal de ABCA1 en células hepáticas y macrófagos en condiciones de acumulación de colesterol celular.

A pesar de que la dieta alta en grasas utilizada en este trabajo no está enriquecida en colesterol, existen mecanismos que explicarían su acumulación intracelular debido a la modificación del flujo de colesterol en las células musculares. O'Reilly y cols. (25) describieron que la exposición crónica a una dieta alta en grasas, específicamente en ácidos grasos saturados produce una alteración en el TRC desde el hígado hacia las heces fecales, provocando un aumento del colesterol plasmático y una disminución del *clearance* desde la circulación. En este estado se observa además un aumento del tamaño de las HDL maduras y una disminución de las HDL pequeñas o nacientes. La conformación proteínica de las HDL se ve modificada, principalmente por acumulación de proteínas de fase aguda derivadas del hígado alterando su función anti-aterogénica y anti-inflamatoria. Todos estos cambios ocurren paralelamente con una disminución del flujo de salida de colesterol dependiente de ABCA1. Esta respuesta podría explicarse por una alteración en la interacción entre las apoA-1 presentes en las HDL pequeñas o nacientes y ABCA1. La ApoA-1 es un componente esencial de las HDL y es imprescindible para el inicio del TRC. La interacción de apoA-1 con ABCA1 promueve un aumento de los niveles de ABCA1 disminuyendo su degradación (74). También se ha descrito que la interacción entre estas proteínas activa distintas vías de señalización que estabilizan a ABCA1, aumentan su actividad y modifican su transcripción (75). Por lo tanto, la carga lipídica generada por una dieta alta en grasas modifica la morfología de las HDL y en consecuencia podría interferir en su interacción con ABCA1, limitando el flujo de colesterol y favoreciendo la acumulación de éste a nivel intracelular.

Se ha reportado que la expresión de ABCA1 también está determinada por la composición lipídica a la cual es expuesta la célula. Ku y cols. (76) demostraron que la exposición a ácidos grasos poli-insaturados como el ácido linoleico, tienen un efecto represor de los niveles de ARNm y de la proteína de ABCA1 en cultivos celulares de hígado e intestino delgado, no así frente a la exposición de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico. Los autores proponen mecanismos post-traduccionales que explicarían el efecto represor sobre la proteína de ABCA1, disminuyendo su estabilidad y vida media en la membrana plasmática. Aun así, la evidencia no logra esclarecer completamente el mecanismo de disminución del ARNm ni de la proteína de ABCA1.

En condiciones fisiológicas la expresión de ABCA1 está regulada principalmente por la activación del receptor nuclear de hígado X (LXR, *Liver-X-Receptor*, de sus siglas en inglés) y su dimerización con el receptor nuclear retinoico X (RXR, *Retinoic-X-Receptor*, de sus siglas en inglés) (7). La presencia de oxisteroles es necesaria para activar estos factores de transcripción, por lo que un exceso de colesterol intracelular produce una respuesta de retroalimentación negativa, que contrarresta la acumulación anómala de colesterol mediante el aumento de la transcripción de ABCA1 (7). Nuestros resultados sugieren que la exposición crónica de una dieta alta en grasas genera una respuesta no adaptativa de las fibras musculares frente al aumento de colesterol intracelular, favoreciendo su acumulación. Sin embargo, la expresión de ABCA1 también puede disminuir en presencia de estados pro-inflamatorios, como es en el caso de la obesidad, en la cual existe un estado de inflamación crónica por aumento de citoquinas inflamatorias circulantes provenientes del tejido adiposo (7,77,78), lo que podría explicar, en parte, esta respuesta a más largo plazo sobre la expresión de ABCA1. La disminución de esta proteína fue confirmada además por ensayos de inmunocitoquímica, donde se observa una localización en la periferia de la célula y en patrón estriado al interior de ésta (Fig. 3), similar a lo observado por Wellington y cols., quienes muestran una distribución de ABCA1 a lo largo de las estriaciones de la célula muscular normal (79). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la dieta alta en grasas tiene efectos moduladores sobre la transcripción de ABCA1.

Dado que la dieta alta en grasas tiene influencias en otras vías metabólicas que explican el mecanismo de producción de la RI, se estableció un modelo *Knock-down* para ABCA1 con el fin de aislar el efecto que tiene su disminución sobre el contenido de colesterol y la captación de glucosa, logrando reducir la expresión de esta proteína en un 70%, similar a lo observado en otros modelos celulares (26,80). ABCA1 transporta colesterol desde las reservas intracelulares y desde la membrana celular hacia aceptores extracelulares (11). La disminución del contenido de ABCA1 tiene repercusiones directas en el contenido de colesterol como se observa en la figura 5, mostrando un aumento en el contenido total de colesterol en las fibras musculares *Knock-down* para ABCA1, lo que sugiere una acumulación anómala de colesterol

comparada con las fibras control. El contenido de colesterol afecta las propiedades físico-químicas de las membranas biológicas, modificando el estado de fluidez, limitando la fuga de iones, modulando señales de transducción y el tráfico de proteínas de membrana (81). Han sido descritos dominios proteicos específicos de unión a colesterol llamados CRAC y CARC (61,82), los cuales tienen una alta afinidad por colesterol y modulan la función y conformación estructural de las proteínas de membrana. Cualquier cambio en el contenido de colesterol modificará la función de estas proteínas (83). Nosotros hemos observado en base a un análisis bioinformático, que GLUT4 presenta 7 de estos dominios altamente afines al colesterol (datos no mostrados). Por lo tanto, GLUT4 no está exenta de modificaciones en su función/estructura debido a cambios en el contenido de colesterol de membrana, mecanismo alternativo que podría explicar una disminución en la captación de glucosa.

La proteína Akt y específicamente Akt2 es un nodo de señalización que interviene en la translocación de GLUT4 y en la captación de glucosa dependiente de insulina (53). En presencia de insulina se observa una disminución de la fosforilación en S473 en las fibras de animales *Knock-down* para ABCA1 en comparación con los animales control. Esto sugiere que la disminución de la proteína de ABCA1 y/o la acumulación de colesterol en la membrana disminuyen la activación de Akt mediada por insulina, modificando la cascada de señalización río abajo de esta vía. Esta es la primera vez que se muestra una disminución en la activación de Akt en fibras musculares adultas debido a cambios en el contenido de ABCA1. Basado en estos resultados podemos anticipar que la translocación de las vesículas de GLUT4 y la captación de glucosa se verán disminuidas en las fibras *Knock-down* para ABCA1. Esto se confirma parcialmente en la figura 7, donde se muestra una disminución de la captación de glucosa mediada por GLUT4 posterior a la estimulación con insulina en fibras *Knock-down* para ABCA1. Otros estudios han mostrado un comportamiento similar, en los cuales una disminución o ausencia de ABCA1 y/o la acumulación de colesterol intracelular favorece al desarrollo de un estado de RI (26,56,57,84).

A pesar de los antecedentes mostrados en este trabajo, quedan algunas interrogantes futuras que nos permitirán caracterizar más detalladamente el

mecanismo de RI en fibras musculares por acumulación de colesterol. En este trabajo los experimentos realizados con filipina III para determinar el colesterol celular son imágenes de epifluorescencia (Fig. 5). Nuestros resultados no especifican la distribución diferencial de colesterol entre sarcolema y TT, información de relevancia dado que la translocación de GLUT4 por estimulación del receptor de insulina tiene una marcada preferencia por los TT (85). Por otro lado, los mecanismos que actualmente describen la génesis de la RI confluyen en la alteración de la activación de IRS1/2 (53), por lo que sería de interés establecer su participación en el mecanismo propuesto en este trabajo. Por último, a pesar de que Akt2 es el principal nodo de señalización que permite la translocación de GLUT4 a la membrana celular, hay otros nodos de señalización que no dependen de la insulina, como es el caso de la vía mediada por AMPK (vía independiente de insulina). Esta vía podría estar involucrada en contextos de estrés celular y sobrecarga metabólica, como es el caso de los animales RI alimentados crónicamente con una dieta alta en grasas.

Este trabajo muestra por primera vez la participación de ABCA1 en la regulación del contenido de colesterol y el transporte de glucosa en el músculo esquelético de ratones adultos. Sin embargo, los resultados no establecen una causalidad entre estos dos fenómenos. Por esta razón, estamos trabajando para determinar si los efectos observados son mediados por el aumento del contenido de colesterol en la fibra muscular. Así, hemos comenzado a explorar si la preincubación con M β CD en fibras electroporadas con *shABCA1*-RFP revierte el efecto deletéreo generado por la disminución de ABCA1. Estos resultados y futuros experimentos permitirán establecer una posible relación causal entre la desregulación del colesterol celular y la RI en las fibras musculares.

CONCLUSION

El presente trabajo nos ha permitido entender la importancia de la proteína ABCA1 y su efecto sobre el metabolismo de la glucosa en células musculares esqueléticas. La alteración del flujo del colesterol aparece como un posible mecanismo que favorece el desarrollo de RI. De esta manera, los mecanismos que puedan aumentar o disminuir el colesterol intracelular podrían afectar el transporte de glucosa y la sensibilidad a la insulina, como un mecanismo independiente a los propuestos hasta el momento.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que ABCA1 juega un papel fundamental en la captación de glucosa en fibras musculares de ratones adultos. Los principales resultados de esta tesis se resumen a continuación:

- 8 semanas de una dieta alta en grasas genera una disminución del ARNm y la proteína de ABCA1, así como su localización en la fibra muscular aislada.
- La disminución de ABCA1 a través de un plasmidio *shABCA1-RFP* produce una acumulación de colesterol en las fibras musculares comparadas con las fibras control.
- La disminución de ABCA1 altera la vía de señalización dependiente de insulina, disminuyendo la fosforilación de Akt2 en serina 473 posterior a la estimulación con insulina.
- La disminución de ABCA1 anula la captación de glucosa dependiente de insulina en fibras *Knock-Down* para ABCA1.

Nuestros datos confirman la hipótesis propuesta en este trabajo y permiten establecer una asociación entre el manejo intracelular de colesterol y el transporte de glucosa. La conclusión de este trabajo es que ABCA1 participa en la regulación del contenido de colesterol intracelular y en el transporte de glucosa dependiente de insulina. Establecer los fenómenos que subyacen a la acumulación de colesterol nos permitirán explicar un nuevo mecanismo para el desarrollo de RI, abriendo un nuevo blanco farmacológico para la RI y la DM2.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- ATP-binding cassette transporter ABCA1 is decreased in skeletal muscle from insulin resistant mice. Llanos, P.; **Sanchez-Aguilera, P.**; Cerda-Kohler, H.; Diaz, A.; Arias-Calderón, M.; Campos, C.; Contreras, A.; Hidalgo, C.; Jaimovich, E. Experimental Biology 2016. San Diego, CA, USA. 2-6 Abril 2016.
- Role of ABCA1 on membrane cholesterol content and glucose uptake in skeletal muscle. **Sanchez-Aguilera, P.**; Diaz, A.; Campos, C.; Cerda, H.; Contreras, A.; Hidalgo, C.; Jaimovich, E.; Llanos, P. Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. Valdivia, Huilo-Huilo, Chile. 6-9 Septiembre 2016.

MANUSCRITOS

- “Membrane cholesterol in skeletal muscle: A novel player in muscle function and insulin resistance”. Barrientos G.; **Sánchez-Aguilera P.**; Jaimovich E.; Hidalgo C.; Llanos P. Revisión enviada al número especial “The Underlying Mechanisms of Diabetic Myopathy of Journal of Diabetes Research” en Diciembre 2016. Aceptada en Febrero 2017.
- “Role of ABCA1 on membrane cholesterol content and glucose uptake in skeletal muscle fibers”. **Sanchez-Aguilera, P.**; Diaz, A.; Campos, C.; Cerda, H.; Contreras, A.; Hidalgo, C.; Jaimovich, E.; Llanos, P.

BIBLIOGRAFIA

1. Ohashi, R.; Mu, H. Wang, X.; Yao, Q.; Chen, C. "Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis". *Mon J Assoc Physicians*. 98(12):845–56, 2005.
2. Levinson, S.S.; Wagner, S.G. "Implications of reverse cholesterol transport: Recent studies". *Clin Chim Acta*. 439:154–61, 2015.
3. Shen, W.; Azhar, S.; Kraemer, F.B.; "Lipid droplets and steroidogenic cells". *Exp Cell Res*. 1–6, 2015.
4. Berg, J.M.; Stryer, J.L.; Lubert, T. "Biochemistry Seventh Edition". Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 160 p, 2012.
5. Eberlé, D.; Hegarty, B.; Bossard, P.; Ferré, P.; Foufelle, F. "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis". *Biochimie*. 86(11):839–48, 2004.
6. von Eckardstein, A.; Kardassis, D. "High Density Lipoproteins" Springer International Publishing; 24:527-565, 2015.
7. Schmitz, G.; Langmann, T. "Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression". *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1735:1–19, 2005.
8. Lewis, G.F. "New Insights Into the Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport". *Circ Res*. 96(12):1221–32, 2005.
9. Thiebaut, D.; Jacot, E.; DeFronzo, R.; Maeder, E.; Jequier, E.; Felber, J.P. "The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man". *Diabetes*. 31(11):957–63, 1982.
10. Brewer, H.B. "Regulation of Plasma High-Density Lipoprotein Levels by the ABCA1 Transporter and the Emerging Role of High-Density Lipoprotein in the Treatment of Cardiovascular Disease". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.

24(10):1755–60,2004.

11. Yancey, P.G.; Bortnick, A.E.; Kellner-Weibel, G.; De la Llera-Moya, M.; Phillips, M.C.; Rothblat, G.H. "Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(5):712–9,2003.
12. O'Malley, J.P.; Soltys, P.A.; Portman, O.W. "Interaction of free cholesterol and apoproteins of low and high density lipoproteins with isolated rabbit hepatocytes". *J Lipid Res.* 22(8):1214–24,1981.
13. Fitzgerald, M.L. "Naturally Occurring Mutations in the Largest Extracellular Loops of ABCA1 Can Disrupt Its Direct Interaction with Apolipoprotein A-I". *J Biol Chem.* 277(36):33178–87,2002.
14. Bungert, S.; Molday, L.L.; Molday, R.S. "Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites". *J Biol Chem.* 276(26):23539–46,2001.
15. Salinas, C.A.; Cruz-Bautista, I.; Mehta, R.; Villarreal-Molina, M.T.; Pérez F.J.; Tusié-Luna, M.T.; et al. "The ATP-binding cassette transporter subfamily A member 1 (ABC-A1) and type 2 diabetes: an association beyond HDL cholesterol". *Curr Diabetes Rev.* 3(4):264–7, 2007.
16. Remaley, T.; Stonik, J.; Demosky, S.J.; Neufeld, E.B.; Bocharov, V.; Vishnyakova, T.G.; et al. "Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter". *Biochem Biophys Res Commun.* 280(3):818–23, 2001.
17. Wang, X.; Collins, H.L.; Ranalletta, M.; Fuki, I. V.; Billheimer, J.T.; Rothblat, G.H.; et al. "Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo". *J Clin Invest.* 117(8):2216–

- 24, 2007.
18. Brunham, L.R.; Kang, M.H.; Van Karnebeek, C.; Sadananda, S.N.; Collins, J.A.; Zhang, L-H.; et al. "Clinical, Biochemical, and Molecular Characterization of Novel Mutations in ABCA1 in Families with Tangier Disease". *JIMD Reports*. 51–62, 2014
 19. Koseki, M.; Matsuyama, A.; Nakatani, K.; Inagaki, M.; Nakaoka, H.; Kawase, R.; et al. "Impaired insulin secretion in four Tangier disease patients with ABCA1 mutations". *J Atheroscler Thromb*. 16(3):292–6, 2009.
 20. Denis, M.; Bissonnette, R.; Haidar, B.; Krimbou, L.; Bouvier, M.; Genest, J. "Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines". *Mol Genet Metab*. 78(4):265–74,2003.
 21. Stenkula, K.G.; Lindahl, M.; Petrlova, J.; Dalla-Riva, J.; Göransson, O.; Cushman, S.W.; et al. "Single injections of apoA-I acutely improve in vivo glucose tolerance in insulin-resistant mice". *Diabetologia*. 57:797–800, 2014.
 22. Patel, D.C.; Albrecht, C.; Pavitt, D.; Paul, V.; Pourreyron, C.; Newman, S.P.; et al. "Type 2 diabetes is associated with reduced ATP-binding cassette transporter A1 gene expression, protein and function". *PLoS One* 6(7):e22142, 2011.
 23. Frank, P.G.; Cheung, M.W.; Pavlides, S.; Llaverias, G.; Park, D.S.; Lisanti, M.P.; et al. "Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis". 291:H677–H686, 2006.
 24. Chao, W.T.; Tsai, S.H.; Lin, Y.C.; Lin, W.W.; Yang, V.C. "Cellular localization and interaction of ABCA1 and caveolin-1 in aortic endothelial cells after HDL incubation". *Biochem Biophys Res Commun*. 332(3):743–9, 2005.
 25. O'Reilly, M.; Dillon, E.; Guo, W.; Finucane, O.; McMorrow, A.; Murphy, A.; et al.

- "High-density lipoprotein proteomic composition, and not efflux capacity, reflects differential modulation of reverse cholesterol transport by saturated and monounsaturated fat diets". *Circulation*. 133(19):1838–50, 2016.
26. de Haan, W.; Bhattacharjee, A.; Ruddle, P.; Kang, M.H.; Hayden, M.R. "ABCA1 in adipocytes regulates adipose tissue lipid content, glucose tolerance, and insulin sensitivity". *J Lipid Res*. 55(3):516–23, 2014.
 27. Farrell, P.; Joyner, M.; Caizozzo, V. "Advanced Exercise Physiology". Lippincott Williams and Wilkins. 3–407, 2012.
 28. Hoppeler, H. "Skeletal muscle substrate metabolism". *Int J Obes Relat Metab Disord*. 23 Suppl 3:S7–10, 1999.
 29. Houston, H. "Application of Nile Probes, for Detection Skeletal Blue and Nile Red, Two Fluorescent of Lipid Droplets in Human". 619–21, 1987.
 30. Prats, C.; Gomez-Cabello, A.; Nordby, P.; Andersen, J.L.; Helge, J.W.; Dela, F.; et al. "An optimized histochemical method to assess skeletal muscle glycogen and lipid stores reveals two metabolically distinct populations of type I muscle fibers". *PLoS One*. 8(10):e77774, 2013.
 31. Ferraro, E.; Giammarioli, A.M.; Chiandotto, S.; Spoletini, I.; Rosano, G. "Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy". *Antioxid Redox Signal*. 21(1):154–76, 2014.
 32. Richter, E.A.; Hargreaves, M. "Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake". *Physiol Rev*. 93(3):993–1017, 2013.
 33. Janssen, I.; Heymsfield, S.B.; Wang, Z.; Ross, R. "Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr". *J Appl Physiol*. 89(1):81–8, 2000.

34. Dohm, G.L.; Tapscott, E.B.; Pories, W.J.; Dabbs, D.J.; Flickinger, E.G.; Meelheim, D.; et al. "An in vitro human muscle preparation suitable for metabolic studies. Decreased insulin stimulation of glucose transport in muscle from morbidly obese and diabetic subjects". *J Clin Invest.* 82(2):486–94, 1988.
35. Ryder, J.W.; Yang, J.; Galuska, D.; Rincón, J.; Björnholm, M.; Krook, A.; et al. "Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients". *Diabetes.* 49(4):647–54. 2000.
36. Bogan, J.S. "Regulation of Glucose Transporter Translocation in Health and Diabetes". *Annu Rev Biochem.* 81(1):507–32, 2012.
37. Gaster, M.; Handberg, A.; Beck-Nielsen, H.; Schroder, H.D. "Glucose transporter expression in human skeletal muscle fibers". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279(3):E529-38, 2000.
38. Jones, J.P.; Tapscott, E.B.; Olson, L.; Pessin, J.E.; Dohm, G.L. "Regulation of glucose transporters GLUT-4 and GLUT-1 gene transcription in denervated skeletal muscle". *J Appl Physiol.* 84(5):1661–6, 1988.
39. Zhao, F-Q.; Keating, A.F. "Functional properties and genomics of glucose transporters". *Curr Genomics.* 8(2):113–28, 2007.
40. Joost, H.G.; Thorens, B. "The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members". *Mol Membr Biol.* 18:247–56, 2001.
41. Lund, S.; Holman, G.D.; Schmitz, O.; Pedersen, O. "Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin". *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(13):5817–

- 21, 1995.
42. Mounier, R.; Th  ret, M.; Lantier, L.; Foretz, M.; Viollet, B. "Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity". *Trends Endocrinol Metab.* 26(6):275–86, 2015.
 43. Ferrannini, E.; Bjorkman, O.L.; Reichard, G.A.; Pilo, A.; Olsson, M.; Wahren, J.; et al. "The Disposal of an Oral Glucose Load in Healthy Subjects A Quantitative Study". 34:580–8, 1985.
 44. Deshmukh, A.S. "Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle". *Horm Mol Biol Clin Investig.* 1;26(1):1–12, 2016.
 45. White, M.F. "The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action". *Molecular and Cellular Biochemistry.* 3–11, 1988.
 46. Johnston, A.M.; Pirola, L.; Van Obberghen, E. "Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling". *FEBS Lett.* 546(1):32–6, 2003.
 47. Musi, N.; Goodyear, L.J. "Insulin resistance and improvements in signal transduction". *Endocrine.* 29(1):73–80, 2006.
 48. Fruman, D.A.; Meyers, R.E.; Cantley, L.C. "Phosphoinositide Kinases". *Annu Rev Biochem.* 67(1):481–507, 1998.
 49. Zierath, J.R.; Krook, A.; Wallberg-Henriksson, H. "Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle". *Diabetologia.* 43:821–35, 2000.
 50. Chen, L.; Chen, R.; Wang, H.; Liang, F. "Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance". *Int J Endocrinol.* 2015:21–9, 2015.
 51. Houstis, N.; Rosen, E.D.; Lander, E.S. "Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance". *Nature.* 440(7086):944–8, 2006.

52. Keane, K.N.; Cruzat, V.F.; Carlessi, R.; de Bittencourt, P.I.; Newsholme, P. "Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction". *Oxid Med Cell Longev*. 2015:1–15, 2015.
53. Højlund, K. "Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance". *Dan Med J*. 61(7):B4890, 2014.
54. Samuel, V.T.; Shulman, G.I. "Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links". *Cell*. 148(5):852–71, 2012.
55. Shoelson, S.E.; Lee, J.; Goldfine, A.B. "Review series Inflammation and insulin resistance". *J Clin Invest*. 116(7):1793–801, 2006.
56. Llanos, P.; Contreras-Ferrat, A.; Georgiev, T.; Osorio-Fuentealba, C.; Espinosa, A.; Hidalgo, C.; Jaimovich, E. "The cholesterol-lowering agent methyl- β -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice". *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 15;308(4):E294–305, 2015.
57. Habegger, K.M.; Hoffman, N.J.; Ridenour, C.M.; Brozinick, J.T.; Elmendorf, J.S. "AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol". *Endocrinology*. 153(5):2130–41, 2012.
58. Penque, B.; Hoggatt, A.M.; Herring, B.P.; Elmendorf, J.S. "Hexosamine biosynthesis impairs insulin action via a cholesterolgenic response". *Mol Endocrinol*. 27(3):536–47, 2013.
59. Fajardo, V.A.; McMeekin, L.; LeBlanc, P.J. "Influence of phospholipid species on membrane fluidity: a meta-analysis for a novel phospholipid fluidity index". *J Membr Biol*. 244(2):97–103, 2011.
60. Al-Qusairi, L.; Laporte, J. "T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal

- muscle and implication in human diseases". *Skelet Muscle*. 1(1):26, 2011.
61. Baier, C.J.; Fantini, J.; Barrantes, F.J. "Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor". *Sci Rep*. 1(X):69, 2011.
 62. Drew, B.G.; Duffy, S.J.; Formosa, M.F.; Natoli, A.K.; Henstridge, D.C.; Penfold, S.A.; et al. "High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus". *Circulation*. 119(15):2103–11, 2009.
 63. Casas, M.; Figueroa, R.; Jorquera, G.; Escobar, M.; Molgó, J.; Jaimovich, E. "IP(3)-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers". *J Gen Physiol*. 136(4):455–67, 2010.
 64. DiFranco, M.; Quinonez, M.; Capote, J.; Vergara, J. "DNA Transfection of Mammalian Skeletal Muscles using *in-vivo* Electroporation". *J Vis Exp*. (32):1–7, 2009.
 65. Carrasco, M.A.; Riveros, N.; Ríos, J.; Müller, M.; Torres, F.; Pineda, J.; et al. "Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells". *Am J Physiol Cell Physiol*. 284(6):C1438–47, 2003.
 66. Jorquera, G.; Juretić, N.; Jaimovich, E.; Riveros, N. "Membrane depolarization induces calcium-dependent upregulation of Hsp70 and Hmox-1 in skeletal muscle cells". *Am J Physiol Cell Physiol*. 297(3):C581-90, 2009.
 67. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; et al. "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal Biochem*. 150(1):76–85, 1985.
 68. Chen, G.; Liu, P.; Pattar, G.R.; Tackett, L.; Bhonagiri, P.; Strawbridge, A.B.; et al. "Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-

- stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism". *Mol Endocrinol.* 20(4):857–70, 2006.
69. Kahn, S.E.; Hull, R.L.; Utzschneider, K.M. "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes". *444(7121):840-6*, 2006.
70. Nam, M.; Choi, M-S.; Jung, S.; Jung, Y.; Choi, J-Y.; Ryu, D.H.; et al. "Lipidomic Profiling of Liver Tissue from Obesity-Prone and Obesity-Resistant Mice Fed a High Fat Diet". *Sci Rep.* 5:16984, 2015.
71. Singaraja, R.R.; James, E.R.; Crim, J.; Visscher, H.; Chatterjee, A.; Hayden, M.R. "Alternate transcripts expressed in response to diet reflect tissue-specific regulation of ABCA1". *J Lipid Res.* 46(10):2061–71, 2005.
72. Merscher-Gomez, S.; Guzman, J.; Pedigo, C.E.; Lehto, M.; Aguillon-Prada, R.; Mendez, A.; et al. "Cyclodextrin protects podocytes in diabetic kidney disease". *Diabetes.* 62(11):3817–27, 2013.
73. Mizuno, T.; Hayashi, H.; Kusuvara, H. "Cellular Cholesterol Accumulation Facilitates Ubiquitination and Lysosomal Degradation of Cell Surface-Resident ABCA1". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 35(6):1347–56, 2015.
74. Wang, N.; Chen, W.; Linsel-Nitschke, P.; Martinez, L.O.; Agerholm-Larsen, B.; Silver, D.L.; et al. "A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I". *J Clin Invest.* 111(1):99–107, 2003.
75. Zhao, G-J.; Yin, K.; Yu-chang, F.; Chao-ke, T. "The Interaction of ApoA-I and ABCA1 Triggers Signal Transduction Pathways to Mediate Efflux of Cellular Lipids". *Mol Med.* 18(2):1, 2012.
76. Ku, C.S.; Rasmussen, H.; Park, Y.; Jesch, E.; Lee, J. " Unsaturated fatty acids

repress the expression of ATP-binding cassette transporter A1 in HepG2 and FHs 74 Int cells". *Nutr Res.* 31(4):278-85, 2011.

77. Panousis, C.G.; Zuckerman, S.H. "Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(6):1565–71, 2000.
78. Hao, X.R.; Cao, D.L., Hu, Y.W.; Li, X.X.; Liu, X.H.; Xiao, J.; et al. "IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRA in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner". *Atherosclerosis.* 203(2):417–28, 2009.
79. Wellington, C.L.; Walker, E.K.; Suarez, A.; Kwok, A.; Bissada, N.; Singaraja, R.; et al. "ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation". *Lab Invest.* 82(3):273–83, 2002.
80. Ragozin, S.; Niemeier, A.; Laatsch, A.; Loeffler, B.; Merkel, M.; Beisiegel U.; et al. "Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(7):1433–8, 2005.
81. An, H.; Nussio, M.R.; Huson, M.G.; Voelcker, N.H.; Shapter, J.G. "Material properties of lipid microdomains: Force-volume imaging study of the effect of cholesterol on lipid microdomain rigidity". *Biophys J.* 99(3):834–44, 2010.
82. Li, H.; Papadopoulos, V. "Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Function in Cholesterol Transport . Identification of a Putative Cholesterol Recognition / Interaction Amino Acid Sequence and Consensus Pattern". *Endocrinology.* 139(12):4991–7, 1988.
83. Fantini, J.; Di Scala, C.; Evans, L.S.; Williamson, P.T.; Barrantes, F.J. "A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological

membranes". *Sci Rep.* 6:21907, 2016.

84. Tang, C.; Liu, Y.; Yang, W.; Storey, C.; McMillen, T.S.; Houston, B.A.; et al. "Hematopoietic ABCA1 deletion promotes monocytosis and worsens diet-induced insulin resistance in mice". *J Lipid Res.* 57(1):100–8, 2016.
85. Lauritzen, H.P.; Ploug, T.; Ai, H.; Donsmark, M.; Prats, C.; Galbo, H. "Denervation and high-fat diet reduce insulin signaling in T-tubules in skeletal muscle of living mice". *Diabetes.* 57(1):13–23, 2008.

ANEXOS

1. Fórmula de dieta alta en grasas (HFD)

Description

Rodent Diet with 60% kcal% fat.

Used in Research

Fatty Liver
Inflammation
Obesity
Diabetes

Packaging

Product is packed in 12.5 kg box.
Each box is identified with the product name, description, lot number and expiration date.

Lead Time

IN-STOCK.
Ready for next day shipment.

Gamma-Irradiation

Yes. Add 10 days to delivery time.

Form

Pellet, Powder, Liquid

Shelf Life

Most diets require storage in a cool dry environment. Stored correctly they should last 6 months.
Because of the high fat content is best if kept frozen.

Formula

Product #D12492	gm%	kcal%
Protein	26.2	20
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
Total		100
kcal/gm	5.24	
Ingredient	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	245	2205
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0
Total	773.85	4057

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.72 mg/gram.
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 216.4
Cholesterol (mg)/kg = 279.6